



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARACTERIZACIÓN DE LA DEFORMACIÓN ÓSEA POR IMAGENEOLÓGIA E
HISTOPATOLOGÍA DE ANFIBIOS DE LA ESPECIE *AGALYCHNIS SPURRELLI*,
DENTRO DEL CENTRO DE CONSERVACIÓN BALSA DE SAPOS

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Médico Veterinaria y Zootecnia

Profesor Guía

MV. M. Ph. D. Sc. Alexander Genoy-Puerto

Autora

Erika Paulina Ortega Torres

Año

2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los trabajos de titulación.

Alexander Genoy-Puerto
MV. M. Ph. D. Sc.
C.C.AQ409705

DECLARACIÓN DEL AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

Erika Paulina Ortega Torres
C.C. 1720992435

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi papá por apoyarme siempre en las decisiones que he tomado en mi vida, a mi mamá por enseñarme a ser una persona valiente, fuerte, además de brindarme su apoyo desde la distancia.

A la institución Balsa de los Sapos por permitir el desarrollo de este estudio, de igual manera, a Andrés Merino, y Freddy Almeida representantes de la institución, por el apoyo técnico y metódico.

A la directiva de los laboratorios de la UDLA: Dra. Mayra Rojas, David Narváez por permitir la utilización de las instalaciones para el desarrollo de la metodología.

Le agradezco al Dr. Alexander Genoy-Puerto por la dedicación y tiempo para el desarrollo de la investigación.

DEDICATORIA

Esta investigación esta dedica a cada doctor y docente que me han permitido seguir adelante para cumplir este sueño.

Dedico mi estudio a mis amigas Greomary, Nathalie, Pamela, Emilie y Estefy por compartir este sueño y demostrar que la amistad une personas.

Por ultimo le dedico a toda mi familia ya que siempre me acompañaron desde el inicio de mi carrera.

RESUMEN

Las especies de anfibios en Ecuador se han visto amenazadas inminentemente, lo que hace necesario la implementación de centros de conservación. El presente estudio se realizó en el Centro de Investigación y Conservación de Anfibios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, cuyo objetivo fue evaluar la deformación ósea de 10 individuos de la rana de la especie *Agalychnis spurrelli* a través de radiología e histopatología. Para estudiar esta manifestación patológica, que se encuentra estrechamente relacionada a las condiciones de cautiverio. Inicialmente, se efectuó un examen físico, evaluando parámetros biométricos y ambientales. Posteriormente se realizó un estudio radiográfico y por último, el proceso de necropsia con la toma de muestra de tejido óseo para elaboración y lectura de placas histológicas. El 90% de animales en estudio presentaron deformación ósea avanzada, mientras que el 10% perteneció a una deformación ósea inicial, correspondiente a individuos con signos de escoliosis, decaimiento, anorexia, grado de desviación de columna y deformación de extremidades y vértebras. En un análisis histopatológico, se evidenció alteraciones del tejido óseo como disminución de osteocitos, condrocitos y células especializadas en la estructura ósea. Las alteraciones óseas presentes correspondieron a la enfermedad metabólica ósea que compromete el estado físico y la estructura ósea de los animales. Estas alteraciones anatómopatológicas pueden comprometer la conservación de esta especie, siendo que los individuos estarían no aptos para reproducción y reintroducción en su hábitat natural; por lo que se recomienda manejar condiciones de cautiverio y alimentación acorde a las especies, para prevenir el desarrollo de estas alteraciones óseas.

ABSTRACT

Amphibian species in Ecuador are constantly threatened, what makes it necessary to implement conservation centers. This study was conducted at Balsa de los Sapos, an organization for research and conservation of endemic species of Ecuador. The main objective of this study was to evaluate bone deformation through radiology and histopathology in frogs belonging to *Agalychnis spurrellii* specie. The pathological manifestation is closely related to the conditions of captivity handled within the institution. The study was conducted in 10 animals, where a physical examination were performed, evaluating biometric and environmental parameters, followed by a radiographic study and finally necropsy samples of bone tissue were sent for processing and the later reading. 90% of the animals in the study had advanced bone deformation, and the remaining 10% belonged to an initial bone deformation, who presented signs of scoliosis, decline, anorexia, different degrees of deviation column and limb and vertebrae deformation diagnosed by radiographic studies. The histopathological analysis presented evident disturbances as decreased bone osteocytes, chondrocytes and specialized cells in the bone structure. The bone alterations present in a metabolic bone disease compromise the physical state and the bone structure of the animal, resulting in ill individuals that are not able for breeding or reintroduction into their natural habitat. Therefore, the conditions of captivity and feed according to the species, should be managed to prevent the development of diseases.

ÍNDICE

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis.....	2
1.2 Objetivos.....	2
1.2.1 Objetivo general.....	2
1.2.2 Objetivos específicos.....	2
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	4
2.1 <i>Agalychnis spurrelli</i>	4
2.1.1 Taxonomía y principales características fenotípicas de la especie ..	4
2.2 Condiciones de cautiverio	5
2.2.1 Temperatura.....	6
2.2.2 Iluminación	6
2.2.3 Humedad.....	7
2.2.4 Alimento	7
2.3 Sistema esquelético anfibios	7
2.3.1 Cráneo.....	7
2.3.2 Columna vertebral	8
2.3.3 Extremidades anteriores y posteriores	8
2.4 Metabolismo calcio/fósforo.....	9
2.4.1 Calcio	9
2.4.2 Fósforo	10
2.5 Enfermedad metabólica ósea.....	10
2.5.1 Etiología	10
2.5.3 Diagnóstico.....	11
2.5.4 Tratamiento	11
2.6 Estudio radiográfico	12
CAPITULO III: METODOLOGÍA	14
3.1 Área de estudio.....	14
3.2 Diseño de estudio.....	15

3.3	Animales.....	15
3.4	Evaluación higiénica ambiental del terrario.	16
3.5	Examen físico clínico del animal.....	17
3.6	Eutanasia	19
3.8	Necropsias	21
3.8.1	Colección de muestras	22
3.9	Histopatología	23
3.10	Análisis de resultados	23
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		25
4.1	Aspectos generales	25
4.1.1	Condiciones ambientales de los terrarios.....	25
4.1.2	Parámetros biométricos.....	26
4.2	Específicos.....	26
4.2.1	Cambios morfológicos	26
4.2.2	Diagnóstico radiológico	29
4.2.3	Análisis histológico	33
4.2.4	Hallazgos secundarios	41
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y		
RECOMENDACIONES		43
REFERENCIAS		45
ANEXOS		48

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

La población de anfibios ha disminuido considerablemente debido a factores como destrucción y alteración del hábitat, entre otros de afección ambiental (Poole y Grow, 2009). En el Ecuador se han desarrollado diversos centros de conservación de anfibios donde se busca mantener especies animales que se encuentren en peligro de extinción y estado de vulnerabilidad, para procesos de reintroducción en la biodiversidad. Sin embargo, algunas especies no pueden ser reintroducidas a su hábitat natural, ya que manifiestan diversas enfermedades infecciosas y no infecciosas relacionadas a cautiverio. Además, se debe tener en cuenta que ciertas especies son predisponentes a presentar cierto tipo de enfermedades, como por ejemplo de esto son las ranas *Agalychnis spurrelli*, que manifiestan deformaciones óseas en cautiverio.

Las deformaciones comúnmente son conocidas como enfermedad metabólica ósea (EMO), donde su manifestación está en relación con requerimientos de luz ultravioleta (UV) /o alimentación, es decir, con condiciones de cautiverio que deben ser manejadas acorde a cada especie (Mitchell y Tully, 2015, p. 358).

La presente investigación se realizó en base a la manifestación de dicha patología dentro de la Institución Balsa de los Sapos, una institución ecuatoriana que se encarga de mantener especies de anfibios en estado de conservación vulnerable. El estudio generará información en cuanto a la aplicación de nuevas técnicas clínicas en especies en cautiverio, que permitan un avance en el diagnóstico de patologías a presentarse en anfibios ecuatorianos. Por ende, está enfocado a instituciones que mantienen especies en conservación brindando información sobre diagnósticos radiológicos e histopatológicos.

Además, el estudio se encuentra en concordancia con los objetivos de la institución y Plan del Buen Vivir, siendo estos, la preservación y conservación de especies de anfibios e incentivación de realización de estudios, investigaciones y entendimiento de la biodiversidad sustentable (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo – Senplades, 2013).

Los estudios veterinarios realizados en anfibios son mínimos dentro del país, por lo cual la presente investigación, además de generar valiosa información sanitaria en este taxón, permite a la Escuela de Veterinaria y Zootecnia de la UDLA ser pionera en estos estudios. Esto ayuda al cumplimiento del plan estratégico de la Universidad de las Américas 2015-2019, que busca generar publicaciones científicas y promover la participación de estudiantes y docentes en la rama de investigación (Universidad de las Américas, 2015).

El presente trabajo forma parte del proyecto realizado por la Universidad de las Américas con la participación de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, titulado “Estudio preliminar de causas y enfermedades bacterianas, micóticas y parasitarias en *Atelopus* sp. y *Gastrotheca riobambae* cautivas de la Balsa de Sapos”, lo cual permite fortalecer la cooperación entre instituciones e intercambiar conocimientos entre biólogos y médicos veterinarios.

1.1 Hipótesis

Las especies en cautiverio tienden a desarrollar enfermedades no infecciosas como deformaciones óseas presentando manifestaciones anatomopatológicas y radiológicas relacionadas con la enfermedad metabólica ósea (EMO).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Caracterizar a la deformación ósea por imagenología e histopatología de anfibios de la especie *Agalychnis spurrelli*., dentro del centro de conservación La Balsa de Sapos.

1.2.2 Objetivos específicos

Analizar el grado de deformidad de los individuos a través de un examen radiográfico.

Caracterizar los cambios anatómicos presentes en deformaciones óseas de la especie *Agalychnis spurrelli* mediante histopatología.

Determinar la relación entre las condiciones de cautiverio con la presentación de la enfermedad metabólica ósea en animales de la Balsa de Sapos.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 *Agalychnis spurrelli*

A. spurrelli es un anfibio que se distribuye desde el centro occidente de Costa Rica hasta Ecuador, región pacífica. La población de este anfibio, se encuentra entre los 70 y 1000 metros sobre nivel del mar (m.s.n.m) en zonas húmedas y lluviosas. En Ecuador, abarca un área de 19.550 kilómetros cuadrados (km²) distribuida en cuatro provincias dentro de 22 localidades (Ron y Read, 2011). En Ecuador no existe riesgo en cuanto al estatus de conservación de la especie, pero internacionalmente se encuentra en la lista roja de la Unión Internacional para Conservación de la Naturaleza (UICN), donde se determina como preocupación menor (Vargas-S. y Torres, 2005, pp. 20-22).

Los factores que generan amenaza para la especie son deforestaciones, incremento del desarrollo agrícola, contaminación mediante fumigaciones y sobretodo, la presión humana existente dentro de las zonas (Ron y Read, 2011).

2.1.1 Taxonomía y principales características fenotípicas de la especie

Agalychnis spurrelli, es un especie arbórea del orden anura perteneciente a la familia Hylidae y al grupo de *Agalychnis callidryas* (Vargas-S. y Torres, 2005). Caracterizada por ser de tamaño mediano siendo las hembras de mayor longitud que machos, presentan un color verde claro; en flancos y extremidades, tienen una coloración rosado pálido, suelen tener verrugas de coloración blanca con bordes de color negro en el dorso y membranas extensas en las patas. Presentan una pupila vertical negra, iris de color rojizo oscuro y membrana nictitante con líneas doradas, como muestra la Figura 1. En Ecuador, en cuanto a parámetros biométricos, se ha reportado datos de longitud promedio rostro-cloaca en machos: 65.90 milímetros (mm) y en hembras: 74.6 milímetros (mm) (Ortega y Andrade, 2008).



2.2 Condiciones de cautiverio

La palabra “cautiverio” puede estar asociada al mantenimiento de especies animales que se encuentren en condiciones de riesgo, debido a alteraciones de su hábitat o disminución de la población. Así, se ve la necesidad de realizar investigaciones que permitan una posible retroinducción o reproducción y la protección del resto de población dentro de su hábitat natural (Poole y Grow, 2009).

El mantenimiento de las especies en cautiverio se logra mediante alimentación, elaboración de microambientes similares al hábitat de la manera más natural posible, y utilización de técnicas de enriquecimiento conductual como asoleo reproducción, alimentación, entre otros. Una disciplina que ayuda a esta manutención es el enriquecimiento ambiental o conductual, que se define como el proceso dinámico que altera el ambiente de los individuos, estimulando y fomentando su comportamiento natural, brindando bienestar animal (Poole y Grow, 2009).

Los terrarios o recintos son microambientes diseñados para los animales en cautiverio, suelen ser de vidrio, plástico o acrílico; por lo tanto, requieren la

higiene y control adecuado de los mismos para evitar el riesgo de manifestación de enfermedades. Otros aspectos importantes a tomar en cuenta durante el cautiverio, son la bioseguridad de los animales, la adecuada manutención y manejo de instalaciones y equipos, el tratamiento de aguas y protocolos y capacitación del personal. Realizar un plan de manejo que incluya estos aspectos permitirá tener las condiciones adecuadas para la crianza ex situ. El objetivo principal es la conservación de la especie (Barragán y Karol, 2002).

Las instalaciones deben ir acorde a cada especie animal, por lo tanto, es importante para su elaboración y manutención llevar en consideración la historia, anatomía y fisiología de los mismos, y factores como temperatura, humedad, requerimientos de luz y alimentación (Barragán y Karol, 2002).

2.2.1 Temperatura

Al ser animales ectodérmicos, los anfibios dependen de la temperatura y condiciones ambientales. Los requerimientos varían acorde al área geográfica, es decir, animales de clima templado necesitan una temperatura de 18 a 20 grados centígrados (°C), los de clima tropical de 24 a 30 grados centígrados (°C) y los de clima frío de 18 a 24 grados centígrados (°C). La temperatura puede ser manejada con ayuda de calentadores o acondicionadores dependiendo de la ubicación de los recintos (Poole y Grow, 2009).

2.2.2 Iluminación

La iluminación es considerada un aspecto importante para el desarrollo y fisiología de los anfibios, ya que ayuda al metabolismo de calcio, comportamiento y reproducción. La luz natural es limitada cuando se trata en animales de cautiverio, debido a que no está disponible constantemente, para lo cual se utiliza iluminación artificial mediante lámparas que emitan luz ultravioleta de espectro 5.0 a 10.0. Además de mantener procesos de

fotoperiodo con luz natural, el requerimiento de luz es de aproximadamente 10 a 12 horas diarias (Poole y Grow, 2009).

2.2.3 Humedad

La humedad debe asemejarse al hábitat natural, la cual es controlada mediante la regulación de la ventilación tanto de los terrarios como la habitación y cantidad de agua. El uso de humidificadores, acondicionadores o calefactores permitirá el control de humedad. La humedad relativa a la cual las especies se adaptan es del 70% (Wright y Whitaker, 2001).

2.2.4 Alimento

Los requerimientos nutricionales de los animales en cautiverio son mayores, por lo que se debe mantener una dieta similar a la vida silvestre. La disponibilidad de alimento para anfibios es limitada, por lo que en los centros se maneja una dieta a base de insectos, roedores y multivitamínicos, los cuales no cubren los requerimientos nutricionales de los animales, tendiendo a generar problemas de desarrollo, reproductivos y metabólicos (Densmore y Earl, 2008).

2.3 Sistema esquelético anfibios

En el sistema esquelético de los anfibios la nomenclatura de las estructuras que lo conforman es diferente a otros vertebrados.

2.3.1 Cráneo

Conformado por un conjunto de barras óseas, de menor tamaño; se encuentra articulado a la primera vértebra mediante los cóndilos occipitales. Carecen de paladar secundario, poseen una estructura en la parte ventral de la boca denominado paraesfenoides. Delante de los huesos palatinos se encuentran las coanas (Maneyro, Camargo y Da Rosa, 2008).

El aparato hiobraquial se encuentra constituido por estructuras óseas y cartilaginosas, ubicado entre la cintura escapular y mandibular; esta estructura permite la emisión de vocalizaciones en los anuros y a su vez, sirve de apoyo para la musculatura de mandíbula, branquias y lengua. (Maneyro, Camargo y Da Rosa, 2008).

2.3.2 Columna vertebral

Las vértebras se encuentran fusionadas, por lo que constituyen una sola vértebra cervical presentando tres regiones presacral, sacra y potsacral. La cintura pélvica es una estructura modificada debido a que se encuentra fusionada con la última vertebra presacral, articulada con el urostilo o coxis, formado por la unión de vértebras caudales, ubicado entre ileones. Las costillas se pueden encontrar fusionadas o articuladas a las vértebras (Wright y Whitaker, 2001).

2.3.3 Extremidades anteriores y posteriores

Los miembros se encuentran formados por cinco secciones: propodio que hace referencia al húmero y al fémur; epipodio, formado por radio-ulna y tibio-fíbula; mesopodio, muñeca y tobillo; metapodio, son la región palmar y plantar de las patas y falanges (Maneyro, Camargo y Da Rosa, 2008).

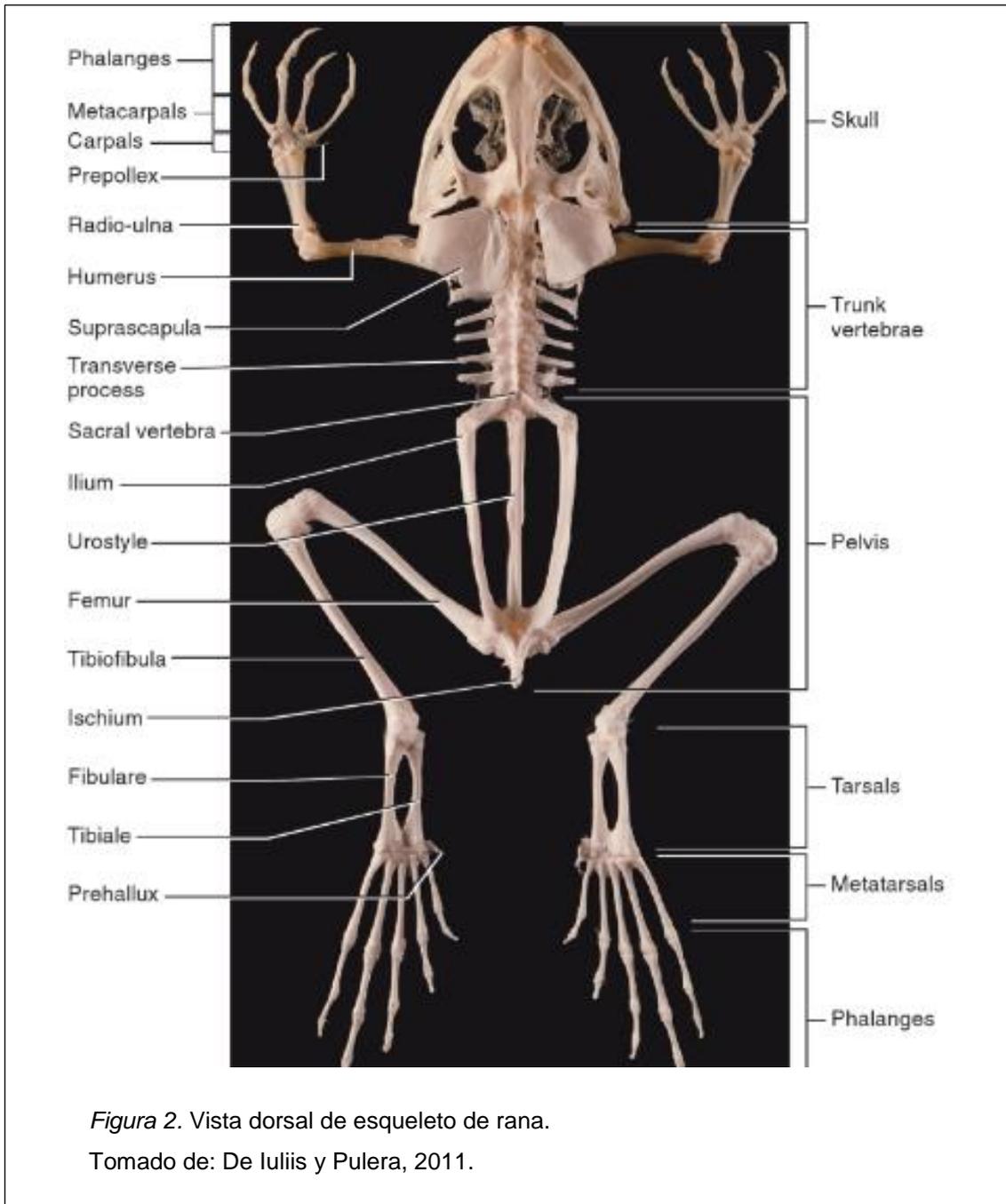


Figura 2. Vista dorsal de esqueleto de rana.

Tomado de: De Iuliis y Pulera, 2011.

2.4 Metabolismo calcio/fósforo

2.4.1 Calcio

El calcio es un mineral que se encuentra en la sangre, encargado principalmente en la formación de hueso, así como procesos metabólicos. La regulación de calcio está dado mediante la absorción en intestino, filtrado glomerular, entrada y salida del mineral de los huesos. El metabolismo del

calcio está controlado por la hormona paratiroidea (PTH) y vitamina D (Cifuentes, 2011).

2.4.2 Fósforo

Nutriente esencial para procesos metabólicos, producción de energía y funcionamiento celular, la concentración se mantiene conjuntamente con el calcio, donde la relación calcio-fosforo es igual 2:1. Se encuentra regulado por los riñones mediante la eliminación a través de la orina y hormonas como insulina; mientras que la hormona paratiroidea (PTH) y factores de crecimiento controlan el metabolismo (Cifuentes, 2011).

2.4.3 Vitamina D

Vitamina formada por la hidroxilación de 25-hidroxicolecalciferol, controlada por la hormona paratiroidea. En el organismo se encuentra como calcitriol, siendo su forma activa. La producción de vitamina D se da con la exposición solar y ayuda a la absorción de calcio. (Mader, 2006).

2.5 Enfermedad metabólica ósea

2.5.1 Etiología

EMO es una patología de carácter nutricional asociada principalmente al equilibrio del calcio y fósforo, los cuales intervienen en el proceso de formación ósea y contracción de la musculatura. Es un trastorno común en anfibios en cautiverio que afecta la integridad, desarrollo y función del hueso (Mitchell y Tully, 2015, p. 358).

La enfermedad se debe a dietas deficientes en calcio o vitamina D, temperatura e iluminación. Las temperaturas inferiores o superiores acorde a cada especie animal van a impedir la correcta digestión de nutrientes. La iluminación de rayos ultravioleta (UV) va a permitir la activación de la vitamina D₃ y por ende, la absorción de calcio (Orós, 2008).

La enfermedad metabólica ósea puede desarrollarse por afecciones secundarias como:

Hiperparatiroidismo secundario nutricional.- Alteración procedente de la excesiva producción de hormona paratiroidea en respuesta a una hipocalcemia, inducida por una deficiencia de calcio o aumento de fósforo en la dieta (Mader, 2006).

Hiperparatiroidismo renal secundario.- enfermedad metabólica ósea de origen no nutricional como consecuencia de una enfermedad crónica renal Desarrollada por una disminución en la filtración glomerular produciendo retención de fósforo, generando niveles altos de fósforo (hiperfosfatemia), disminución de niveles de calcitriol y calcio (hipocalcemia), osteodistrofia renal y calcificación de tejidos blandos (Mader, 2006).

2.5.2 Signos clínicos

Las lesiones primarias que manifiestan los individuos son: deformación, tumefacción y prolapsos de órganos, como consecuencia, se puede generar lesiones secundarias como: gas en el tracto intestinal, tetania y edema (Bertelsen et al., 2003).

Puede estar acompañada de varios síndromes como osteoporosis, osteomalacia, anorexia, osteodistrofia fibrosa e hipocalcemia (Orós, 2008).

2.5.3 Diagnóstico

Para la confirmación de la enfermedad es necesario un estudio radiográfico, mediante el cual se puede evidenciar cortezas delgadas de huesos largos, disminución de densidad ósea, deformación de extremidades y fracturas (Wright y Whitaker, 2001).

2.5.4 Tratamiento

Se puede realizar a través de baños con soluciones con iones de calcio como gluconato de calcio 2,3% de uno a dos baños diarios. Suplementación con calcio y vitamina D3 por vía oral como mínimo 30 días o hasta observar en el

estudio radiográfico aumento de la densidad ósea. El uso de lámparas fluorescentes pueden ser usados como tratamiento complementario de la enfermedad con una exposición de 280 a 310 nanómetros (nm), acorde a las necesidades de cada especie animal (Wright y Whitaker, 2001).

2.6 Estudio radiográfico

Los aparatos radiográficos son utilizados con fines de diagnóstico clínico y seguimiento de enfermedades, los cuales mantienen un protocolo de control y utilización de los mismos.

Eventualmente la radiografía es usada para determinar la densidad de huesos en la enfermedad ósea metabólica, así como para evaluar el sistema esquelético. Es considerado una rutina en anfibios que presenten anomalías musculoesqueléticas, para su diagnóstico de enfermedades se realiza proyecciones dorsoventrales (DV) y ventrodorsales, permitiendo realizar evaluaciones en cuanto a estructura ósea (Mitchell y Tully, 2015, p. 356).

La técnica radiográfica depende de la máquina, tipo de película, tamaño del paciente e intensidad. Dentro de las maquinas utilizadas para estudios de anfibios se encuentran la unidad radiográfica de mamografías, la cual genera imágenes de alta calidad y para su interpretación requiere práctica. También se encuentra la máquina de radiografía dental, la cual posee una variedad de tamaños permitiendo obtener imágenes acorde al tamaño de anfibios (Wright y Whitaker, 2001).

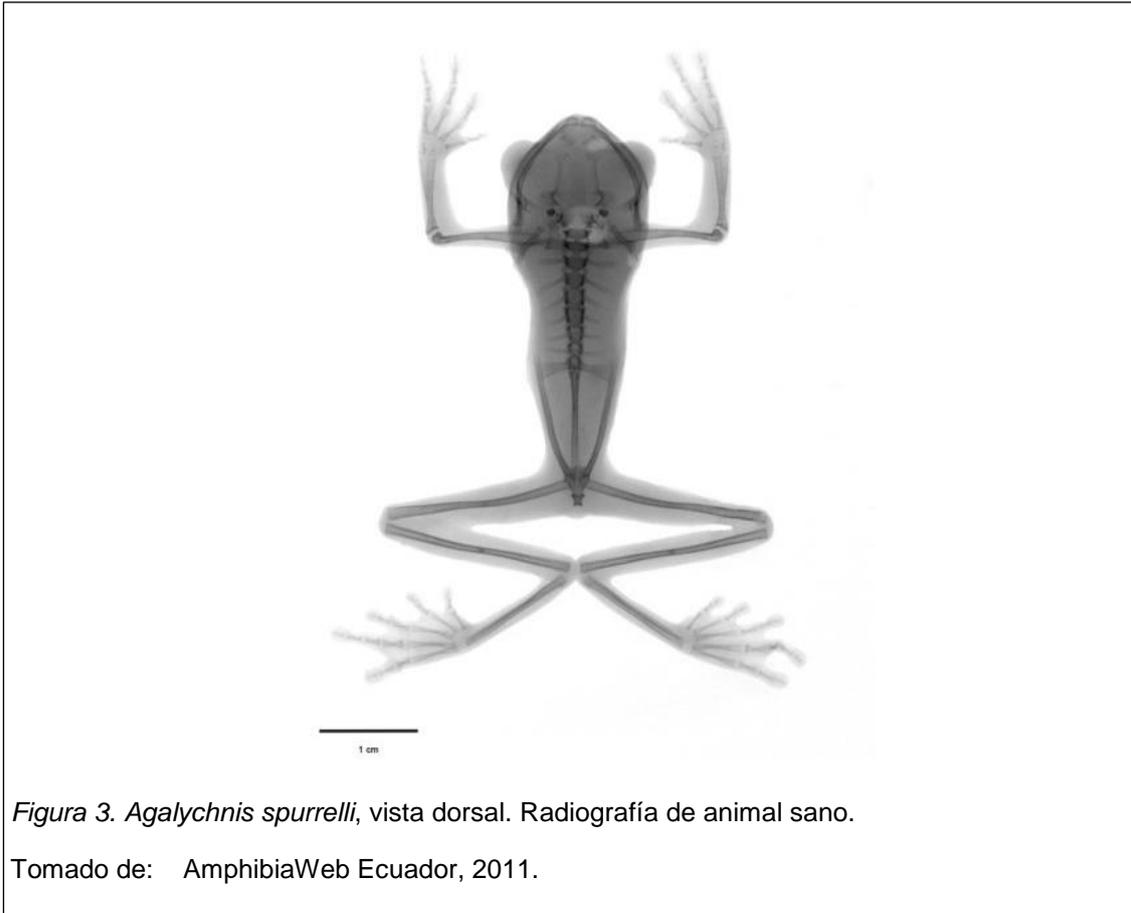


Figura 3. *Agalychnis spurrelli*, vista dorsal. Radiografía de animal sano.

Tomado de: AmphibiaWeb Ecuador, 2011.

2.7 Eutanasia

Algunos autores establecen varios métodos de eutanasia debido a que el metabolismo de cada especie de anfibios varía, dificultando generalizar un método de eutanasia, además de la condición del paciente, diagnóstico y conservación del mismo (Wright y Whitaker, 2001).

Dentro de los métodos químicos que establecen los autores Close, et al (2011), se encuentra el uso de triclaína metano sulfonato, benzocaína y pentobarbital, las cuales se administran disolviéndolas en el agua en donde se encuentre el animal.

CAPITULO III: METODOLOGÍA

3.1 Área de estudio

La presente investigación fue realizada en las instalaciones de la Balsa de los Sapos ubicada en el subsuelo de la Facultad de Biología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. La Balsa de Sapos se encuentra conformada por varias áreas para el mantenimiento de las especies, las cuales mantienen una temperatura acorde a cada individuo. Las áreas que lo conforman son una Sala A y Sala E considerados como el área de ambiente templado; Sala B, área fría y la Sala C, que es el área caliente, además cuenta con un área de enfermería. Dentro de cada sala existen terrarios distribuidos en anaqueles. Cada terrario tiene su respectiva identificación con número y especie, y dependiendo del tamaño de los individuos, se puede encontrar uno o más ejemplares por terrario.

La humedad se logra mantener mediante el riego constante de agua dentro de cada terrario, la cual es activada a ciertas horas, obteniendo un riego de cuatro a cinco veces por día y la iluminación únicamente es mediante luz fría.

Además cuenta con el área de bioterio, encargada de la producción de grillos, roedores, tenebrios, entre otros, que sirven de alimento para las diversas especies en cautiverio.

Los individuos *Agalychnis spurrelli*, se encuentran en la sala C (Figura 4), donde se mantiene una temperatura mayor a los 24°C, debido a las condiciones que necesita esta especie, para lo cual, se usa un calefactor. Dentro de esta sala los terrarios utilizados únicamente son de vidrio para mayor conservación de temperatura y humedad. Los terrarios se encuentran a manera vertical u horizontal distribuidos en dos anaqueles de dos filas.

La limpieza es realizada semanalmente por parte del personal encargado de la sala C y en cuanto a la alimentación se la realiza diariamente con grillos.

Las condiciones de los terrarios permitieron la evaluación higiénica ambiental del terrario y el examen físico del animal.

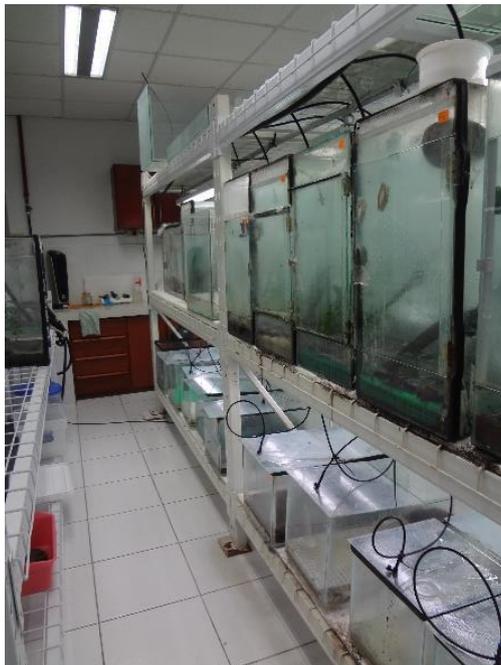


Figura 4. Sala C: distribución de terrarios.

3.2 Diseño de estudio

El estudio es de carácter descriptivo, ya que se realizó un análisis mediante evaluación física, radiografía e histología de la enfermedad metabólica ósea, representando lesiones músculo-esqueléticas que manifestaban los animales afectados.

3.3 Animales

El centro de investigación Balsa de los Sapos cuenta con una población de 80 individuos; de los cuales la institución, permitió la toma de 10% aproximadamente, que presentaron deformaciones óseas a nivel de columna vertebral, prolapsos vesicales. Algunos individuos como signo clínico manifestaron letargia, anorexia.

Este limitado número de individuos fue otorgado en base al fin que persigue la conservación e investigación de especies en cautiverio que mantiene la institución.

3.4 Evaluación higiénica ambiental del terrario.

Para este punto se tomó en consideración la temperatura, humedad y limpieza que deben tener los terrarios de cada animal.

La evaluación de cada terrario (Figura 5), se realizó mediante observación directa obteniendo información sobre el manejo del mismo. Se determinó la presencia de heces, acumulo de alimento, limpieza de terrario, tamaño del mismo acorde al individuo y cantidad de agua. Además se presencié el uso de focos de luz blanca o focos que tenga indicativo de luz ultravioleta (UV).

Se valoraron parámetros ambientales básicos como temperatura externa e interna y humedad relativa a través de un termohigrómetro (Figura 6), que indicaba los datos requeridos.



Figura 5. Evaluación de terrario.



Figura 6. Medición de temperatura y humedad.

3.5 Examen físico clínico del animal

La evaluación física es complementaria al anterior punto descrito. Se determinó la presencia de lesiones o manifestaciones clínicas que pudieron inferir con procesos de tipo infeccioso o no infeccioso en el individuo analizado. Durante el examen físico, en primer lugar, se observó el comportamiento del individuo dentro del terrario, así como movimientos y respuesta a estímulos.

Posteriormente, se realizó la manipulación de los animales, mediante el uso de guantes de látex, para realizar la evaluación externa, teniendo en cuenta la piel, narinas, extremidades, cabeza, tórax, abdomen y cloaca.

Además se estimaron los parámetros biométricos. El peso fue medido mediante el uso de una balanza digital BOECO BBI-41® (Figura 7), la medición de distancia boca – cloaca se realizó a través de un calibrador Scala® (Figura 8) y la circunferencia abdominal mediante una cinta métrica.

Los datos obtenidos de los individuos fueron registrados en fichas clínicas previamente elaboradas. (Anexo 1).



Figura 7. Medición de peso.



Figura 8. Parámetro biométrico: medición de distancia boca-cloaca.

3.6 Eutanasia

Para Wright y Whitaker (2001), la elección del método está dada por el médico involucrado.

El método de eutanasia utilizada en el estudio fue siguiendo el protocolo de la Balsa de los Sapos, haciendo uso Lidocaína Tópica (Roxicaína) al 2%. La colocación del fármaco se realizó de forma directa sobre la piel de los individuos los cuales se encontraban dentro de una tarrina. La dosis fue de 3 a 4 atomizaciones por cada animal. Este método fue utilizado posterior a la evaluación clínica del animal, esperando un tiempo de cinco minutos aproximadamente hasta que haga efecto.

3.7 Técnica radiográfica

La toma de placas radiográficas se realizó dentro de la Facultad de Biología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) mediante el equipo Thermo KeveX X-Ray PXS5®, ver Anexo 2. Se utilizaron factores de kilovoltajes (kV): 40 y miliamperajes (mA): 0,1. Para la toma de las placas radiográficas se posicionó al animal en decúbito dorsal y decúbito ventral en una hoja de acetato que se colocó dentro de la cámara de rayos X (Figura 9); una vez cerrada la cámara, se calibró a los factores establecidos y se procedió a la toma de la placa. La imagen radiográfica se obtuvo mediante el programa Image Acquisition VIVA®. (Figura 10).

Todo este proceso fue realizado en base al protocolo establecido por la Facultad de Biología y mediante la ayuda del PhD y biólogo Andrés Merino de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador para el manejo del equipo.

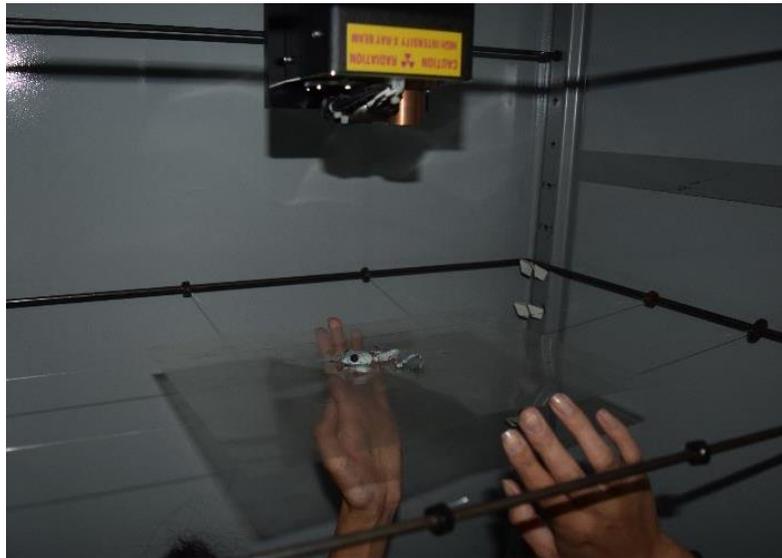


Figura 9. Posicionamiento de individuo dentro del equipo de rayos X. Animal en decúbito ventral.

Tomado por: Genoy-Puerto, Alexander.

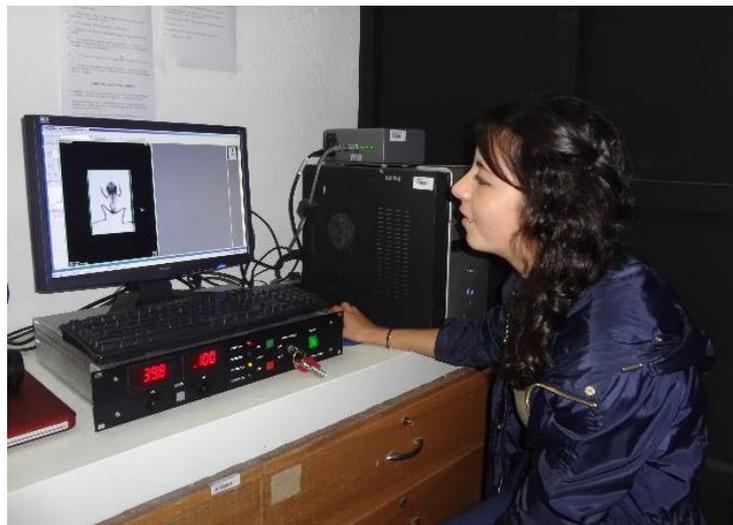


Figura 10. Toma de imagen radiográfica.

Tomado por: Pamela Quishpe

3.8 Necropsias

Las necropsias fueron realizadas dentro del laboratorio 131 de la UDLA, para la cual los individuos fueron colocados en un cooler con hielos para la conservación de los tejidos y evitar alteraciones de los mismos. Esto último a pesar de que no trascurrieron más de dos horas entre la eutanasia y la necropsia.

Las necropsias fueron realizadas siguiendo las metodologías de Peissier y Pinkerton (2003). Inicialmente se realizó un nuevo examen físico del animal eutanasiado en busca de alteraciones no observadas anteriormente y masa corporal para determinar el estado de nutrición.

El proceso se inició con la apertura de la cavidad celómica del animal desde la línea media en dirección hacia craneal (borde inferior de mandíbula) y caudal (cloaca), haciendo uso de un bisturí y ayuda de pinzas anatómicas, evitando lesiones en órganos. Se realizó observación macroscópica de los órganos diagnosticando alteraciones y disposición de estructuras anatómicas, además de características físicas como color, olor y tamaño. Posteriormente se retiraron las vísceras por sistemas y aparatos; se procedió con el seccionamiento de los órganos evaluando lesiones internas, las cuales pudieron ser observadas de mejor manera a través del uso de estereoscopio Kruss.

Después de que todos los órganos fuesen extraídos y examinados, se evaluó el sistema esquelético teniendo en cuenta principalmente la columna vertebral y las extremidades.

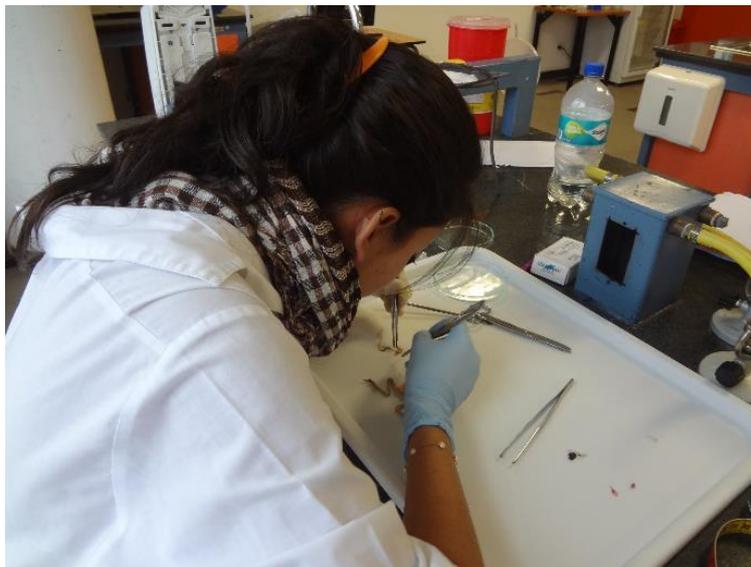


Figura 11. Proceso de necropsia.

Tomado por: Estefanía Villacreses.

3.8.1 Colección de muestras

Una vez realizada la evaluación física de los órganos, se inició con la toma de muestras de cada uno, teniendo en cuenta columna vertebral y extremidades afectadas para su posterior envío al laboratorio de histología de la Universidad de las Américas (UDLA). Todo el proceso de necropsia se realizó mediante apoyo fotográfico que facilitó la investigación en el Laboratorio de genética molecular y biología de la UDLA.

Las muestras tomadas de órganos se colocaron de manera individual en cajas histopatológicas, las cuales contenían el número de terrario, número de órgano y nombre del órgano e internamente, un papel con la misma descripción. Posteriormente las cajas fueron colocadas en un frasco con formol al 10% buferizada, esto permitió la fijación de tejidos.

Pasadas las 24 horas, las muestras fueron colocadas en descalcificante comprobando su acción cada 2 horas, después de 5 horas, se realizó un lavado de etanol al 70% durante 3 horas, posteriormente se inició con el

procesamiento de tejido con una duración de 10 horas. En la estación de inclusión se realizó la formación de bloques de parafina, después se realizaron cortes de tejido a través del micrótopo de un diámetro de 3 micras, la desparanifización en estufa a 60° en un tiempo de 10 a 15 min y por último, se realizó la colocación del tejido en el portaobjetos, siendo sometidos al proceso de coloración de hematoxilina eosina, obteniendo las placas histológicas. Todo este proceso fue realizado en el laboratorio de histología de la UDLA

Después de cada necropsia los animales fueron colocados en frascos de formol al 10% con su respectiva identificación, conservándolos en una caja específica para el almacenamiento de los individuos.

3.9 Histopatología

La observación de las placas se las realizó a través de un microscopio de luz CX21® (Olympus®). El enfoque se inició con el objetivo 4x, posterior 10x y 40x, de ser necesario se utilizaba el objetivo número 100x haciendo uso de aceite de inmersión.

El análisis e interpretación de las mismas fue necesario la utilización de un atlas de histología en anfibios, además de la colaboración del tutor Genoy-Puerto, para mayor diferenciación patologías presentes en los tejidos y definir un diagnóstico histopatológico. La obtención de microfotografías se obtuvo mediante el uso de un microscopio de luz Axio Lab.A1® (Zeiss) y cámara AxioCam Erc 5s® (Zeiss).

3.10 Análisis de resultados

El análisis de resultados se realizó mediante cálculos estadísticos descriptivos a través de una hoja de cálculo de Excel de media y desviación estándar para aspectos generales como condiciones ambientales de los terrarios y parámetros biométricos. Mientras que en aspectos específicos como cambios

morfológicos, diagnóstico radiológico y análisis histológico se realizó cálculos porcentuales.

Además para el diagnóstico radiológico se analizó la clasificación que mantenían los animales acorde al grado de desviación de columna y grado de afección de extremidades.

3.10.1 Grado de desviación de columna vertebral

Los animales que presentaron afección en uno o dos cuerpos vertebrales, al igual que espacios intervertebrales tuvieron una ponderación de leve, mientras que individuos que manifestaron afecciones en más cuerpos vertebrales se clasificaron en grado moderado.

3.10.2 Grado de afección de extremidades

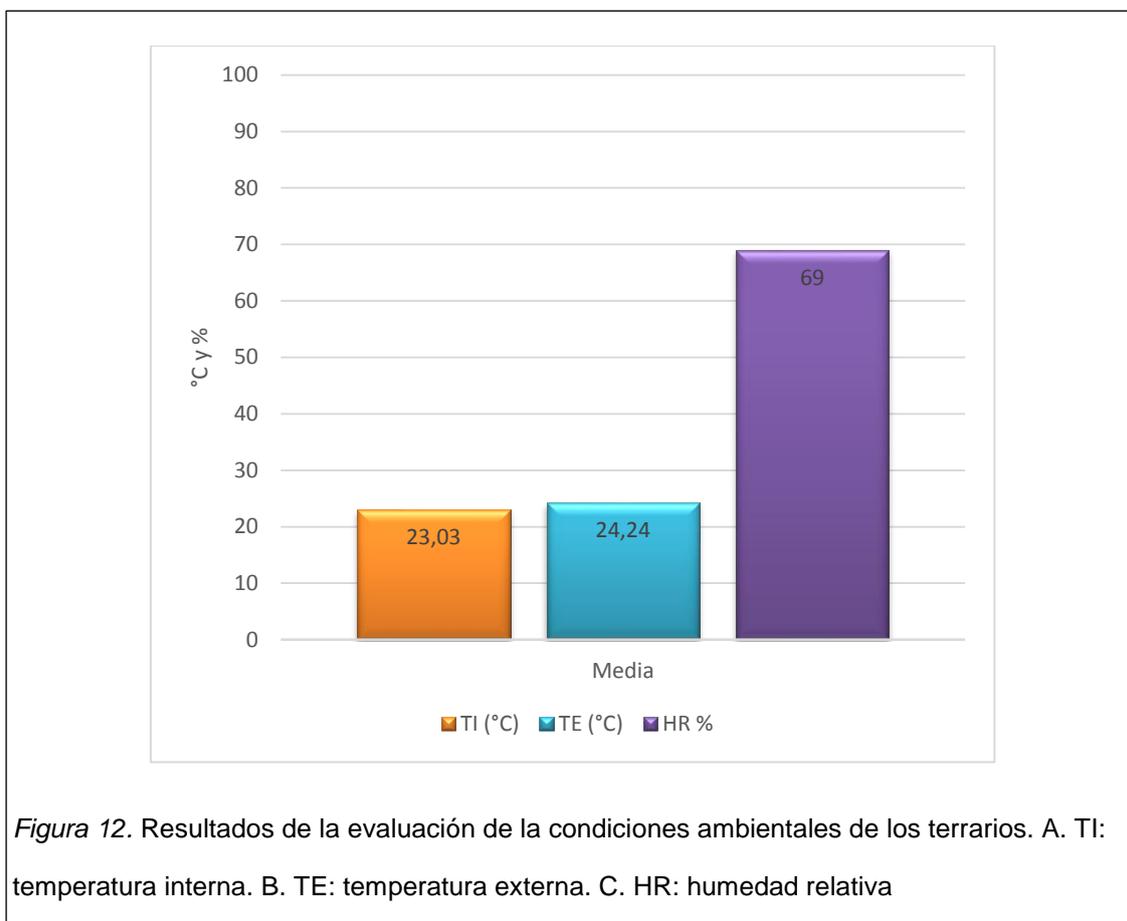
Se evaluó la deformación y el engrosamiento de cada extremidad. Cierta número de animales presentaron afección en un solo miembro siendo clasificado como leve, para individuos con dos o tres miembros afectados fueron considerados como moderados. La afección de todos los miembros con deformación marcada tuvo una ponderación severa. De igual manera animales que no presentaban afección en extremidades fueron considerados para la clasificación.

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aspectos generales

4.1.1 Condiciones ambientales de los terrarios

La temperatura *ex situ* de la especie *A. spurrelli* registrada por Ortega-Andrade et. Al (2011), fue en media de 24,6 °C y una humedad relativa en media de 73%. Los rangos de temperatura y humedad relativa en cautiverio dentro de la Balsa de los Sapos, se encuentran en relación a la temperatura en *ex situ*, descrita anteriormente resultado obtenido el cálculo de media de los todos los terrarios en estudio. (Figura 12).



4.1.2 Parámetros biométricos

Los resultados obtenidos, que se muestran en la Tabla 1, constatan que el peso de los machos fue mayor al de hembras y juveniles, siendo más variable el valor en hembras. La medición de distancia boca-cloaca demuestra que las hembras tienen mayor tamaño al de machos y juveniles, dato que brinda correlación a lo establecido por Ortega-Andrade (2008), dentro de su investigación se registra una longitud boca-cloaca de 47.0 – 75.6 mm para machos y 62.0 – 92.8 mm para hembras.

Tabla 1. Resultados de parámetros biométricos.

Especie	Hembras (n=3)	Juveniles (n=3)	Machos (n=4)	Total (n=10)
Peso (gr)				
Media(desviación estándar)	5.83 (± 3.02)	3.69(± 0.88)	6(± 1.87)	5.25(± 2.13)
Distancia boca-cloaca (mm)				
Media (desviación estándar)	48.83 (± 10.17)	44.07(± 2.95)	45.58(± 3.77)	46.10(± 5.80)
Circunferencia abdominal (mm)				
Media (desviación estándar)	66.33(± 40.38)	30(± 10)	30.50(± 8.23)	41.10(± 26.65)

4.2 Específicos

4.2.1 Cambios morfológicos

Los 10 animales en estudio que equivalen al 100%, presentaban un estado de depresión, anorexia, letargia, disminución de condición corporal, movimientos y actividades, y desviación de columna. El 20%, referente a dos individuos, manifestó prolapsos de vejiga, resultado que se obtuvo durante el examen físico de cada animal.

Los prolapsos vesicales comúnmente son manifestados cuando los niveles de calcio son muy bajos para mantener el peristaltismo normal gastrointestinal de los animales, generando estasis intestinal (Mader, 2006).

Además en la valoración física se pudo constatar que la forma corporal de los animales era a manera de “S”, mientras que animales sanos se observaron cuerpos con una forma corporal normal.



Figura 13. Individuo 3773 (6) con prolapso de vejiga.

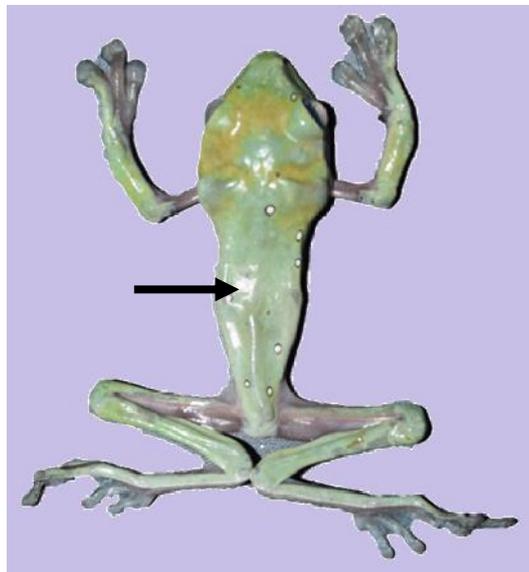


Figura 14. Individuo 3777 con escoliosis indicada por la flecha.

Adaptado de: Alexander Genoy-Puerto.

La deformación ósea de los animales fue analizada mediante la fórmula axial. Esta fórmula hace referencia al número de estructuras vertebrales y número de espacio intervertebral correspondiente a la región presacral y potsacral de columna vertebral, donde el número se puede ver afectado por fusión de cuerpos vertebrales, deformaciones, masas, entre otros (Meza-Joya et.al, 2013). Los resultados obtenidos de la fórmula axial fue correspondiente a la especie animal, es decir que el número de vértebras en región presacral fue de 8, propio de una unidad cervical y siete unidades del tronco vertebral y en región potsacral conformado por la estructura ósea, urostilo.

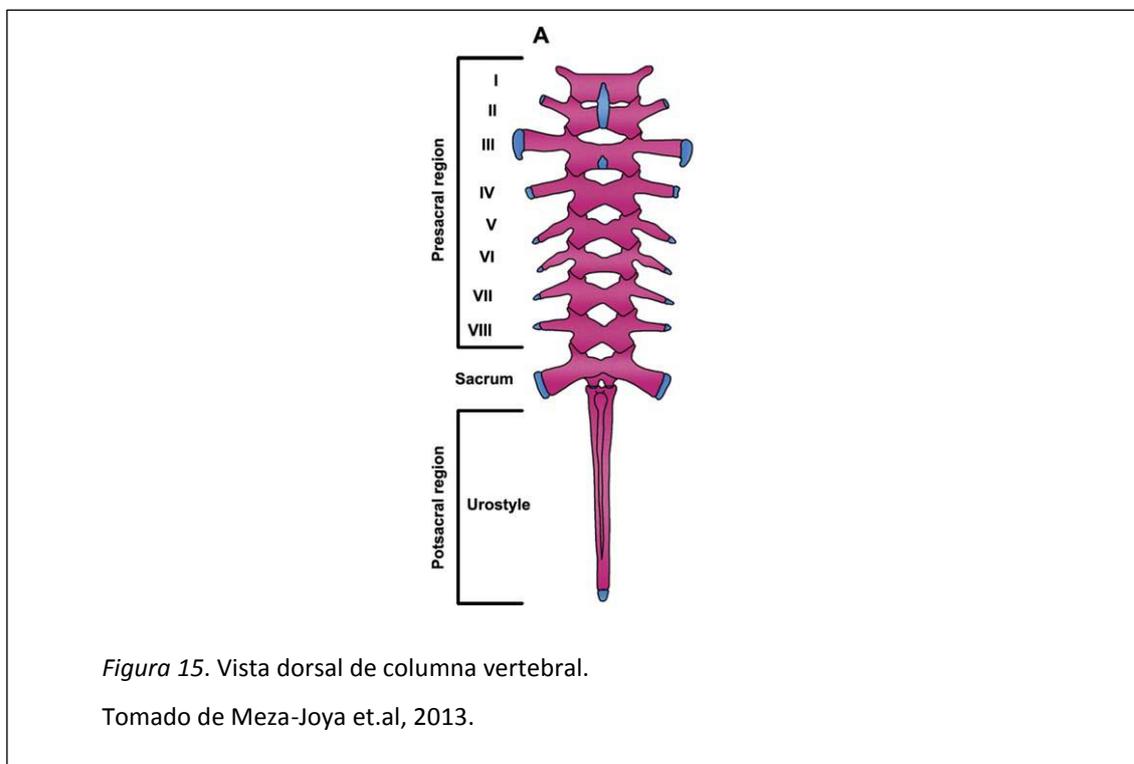


Figura 15. Vista dorsal de columna vertebral.

Tomado de Meza-Joya et.al, 2013.



Figura 16. Valoración de columna vertebral en necropsia.

4.2.2 Diagnóstico radiológico

La desviación de columna, cambios anatómicos y deformaciones fueron valorados en una proyección ventro-dorsal (VD).

El resultado presentado en la figura 17, hace referencia al grado de desviación de columna, que fue obteniendo de una valoración de la forma y dirección de las vértebras, teniendo una población del 50% (5/10) con afección moderada y un 50% con afección leve.

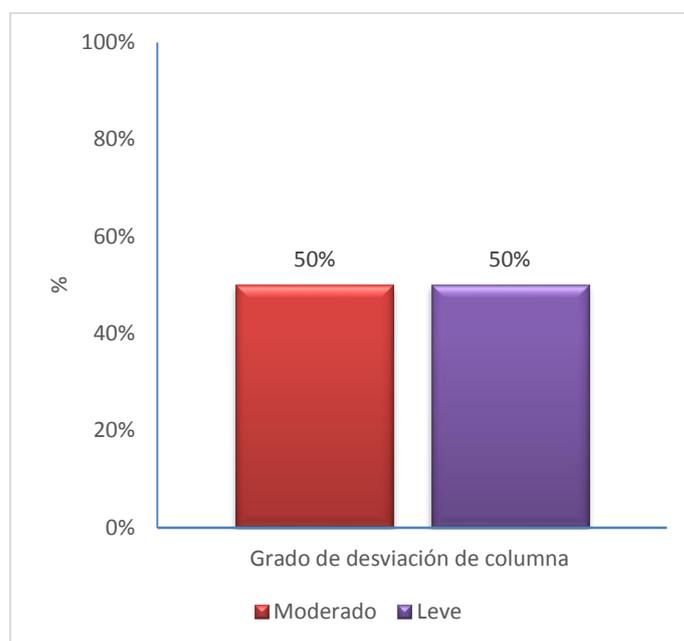


Figura 17. Resultado porcentual del grado desviación de columna vertebral en diagnóstico radiográfico presente en los individuos. (n=10).

Tabla 2. Resultados de afección a nivel vertebral. Elaboración: Autor.

Identificación	Vértebras afectadas
3764	Desviación de urostilo.
3773(1)	Desviación a nivel de vértebra sacra, deformación de Ilión.
3773(2)	Desviación nivel vertebral 7 y sacra.
3773(3)	Desviación a nivel de vértebra 2-3 y aumento de espacio intervertebral misma sección.
3773(4)	Desviación a nivel de vértebra 6-7
3773(5)	Desviación de vertebra 5-6-7, sacra y urostilo.
3773(6)	Desviación de vértebras 6-7 y fractura urostilo.
3773(7)	Desviación de vértebras 4-5, disminución espacio intervertebral 3-4
3774	Desviación leve de vértebra 7-8 y urostilo
3777	Desviación de vértebras 5-6, aumento de espacio intervertebral 7-8, desviación de urostilo.

Nota: Se analizó la ubicación de desviación a través de la afección de los cuerpos vertebrales y espacios intervertebrales.



Figura 18. Proyección ventro-dorsal (VD). Mediante la placa radiográfica se puede apreciar el grado de desviación de la columna vertebral y vértebras afectadas, indicada por flecha.

Los resultados fueron obtenidos mediante la apreciación de las extremidades en el estudio radiológico observado en la Figura 20, clasificando los individuos acorde al grado de deformación ósea y engrosamiento de las extremidades. En la Figura 19, se puede apreciar el porcentaje de individuos que presentaban alteraciones.

El engrosamiento y deformación de extremidades especialmente de huesos largos hace referencia a la patología osteodistrofia fibrosa, desarrollada por un incremento de potasio y disminución de calcio que genera aumento de la parathormona, incrementando la actividad de los osteoclastos. Todo este proceso disminuye la densidad de hueso, compensándolo con depósitos de tejido conectivo fibroso, generando deformaciones óseas. (Orós, 2008).

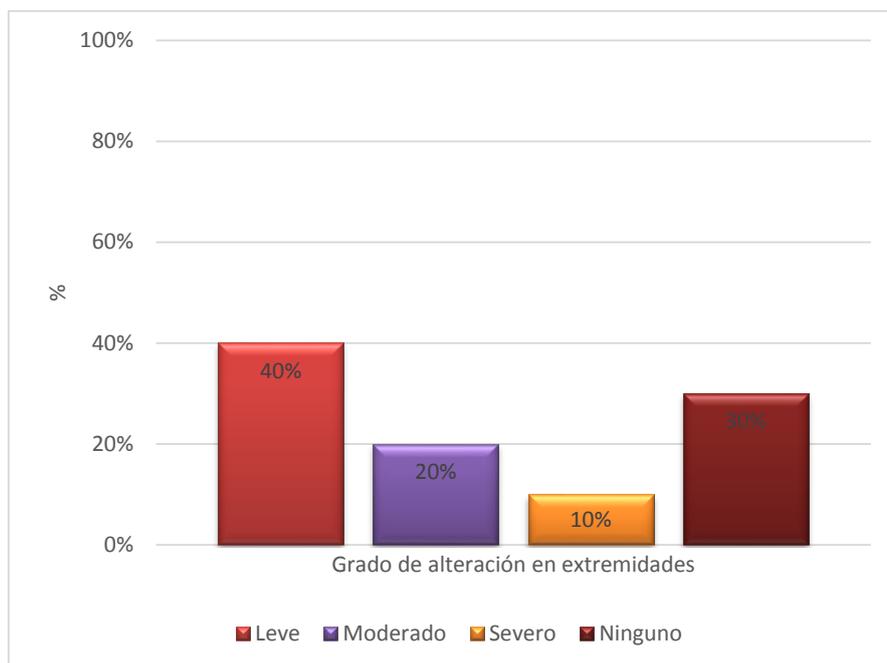


Figura 19. Resultado porcentual de grado de afección en extremidades en base al 100% de los animales estudiados (n=10).



Figura 20. Proyección ventro-dorsal (VD). Se puede apreciar en la imagen radiográfica engrosamiento de extremidades tanto posteriores como anteriores.

4.2.3 Análisis histológico

Los resultados fueron obtenidos mediante la observación y análisis histológico de columna vertebral evaluando alteraciones en tejido vertebral, médula espinal, cuerpo vertebral y músculo paraespinal. Para la discusión se tomó como referencia el estudio de Nanjun et.al (2016), debido a que estudios sobre hallazgos microscópicos histológicos en anfibios son pocos.

4.2.3.1 Tejido vertebral

Dentro de este punto se evalúa tamaño y forma del canal vertebral, presencia de osteocitos y canalículos óseos.

En los resultados obtenidos (Figura 21 y 22) se puede observar que el porcentaje de individuos afectados es alto, donde las alteraciones encontradas en tejido vertebral son deformación y aumento de tamaño de canal vertebral, acompañado de la disminución de canalículos óseos y osteocitos, observado en Figura 24. Teniendo en cuenta las características de un tejido sano descritas por Nanjun et.al, (2016), siendo estas canal vertebral de manera epiléptica, uniforme de tamaño regular, abundante número de células óseas (osteocitos) y canalículos óseos.

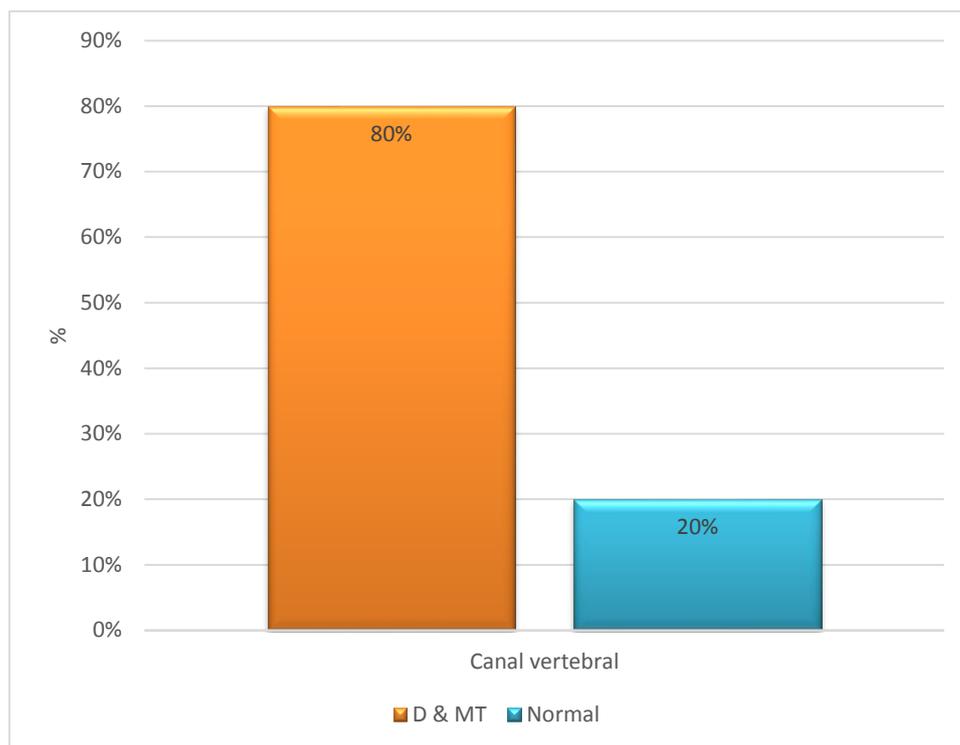


Figura 21. Individuos sin alteración y con alteración en canal vertebral en base al 100%. (n=10). A.D & MT: Deformación y de mayor tamaño.

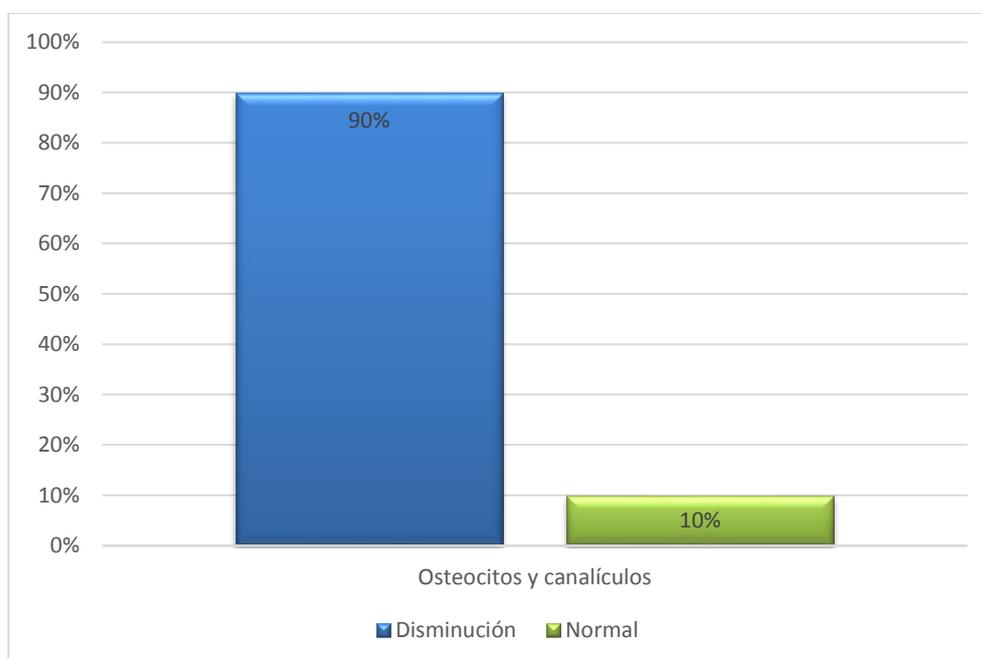


Figura 22. Porcentaje de individuos sin alteración e individuos que presentaron disminución de osteocitos y canaliculos óseos.

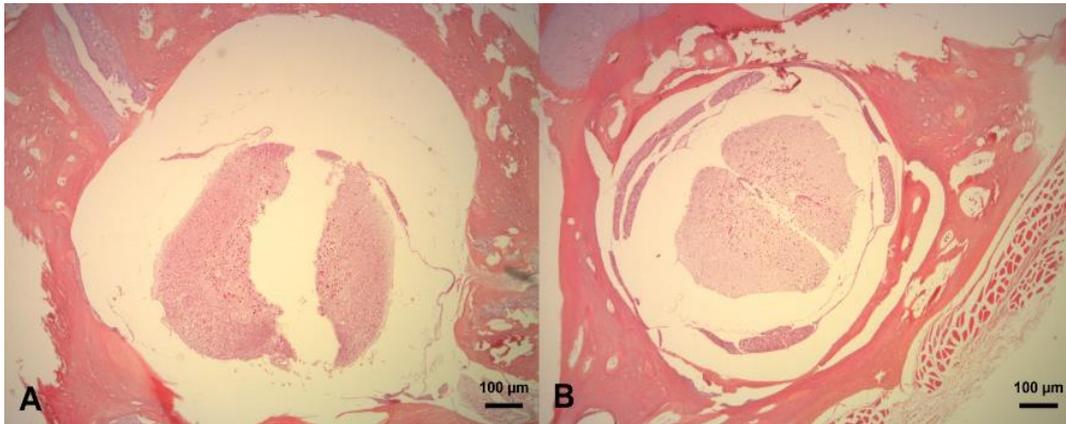


Figura 23. Alteración. Canales vertebral (H&E). 3773(7)-12. A. Canal vertebral irregular con aumento de tamaño. B. Canal vertebral aumentado, presencia de nervios. 4x.

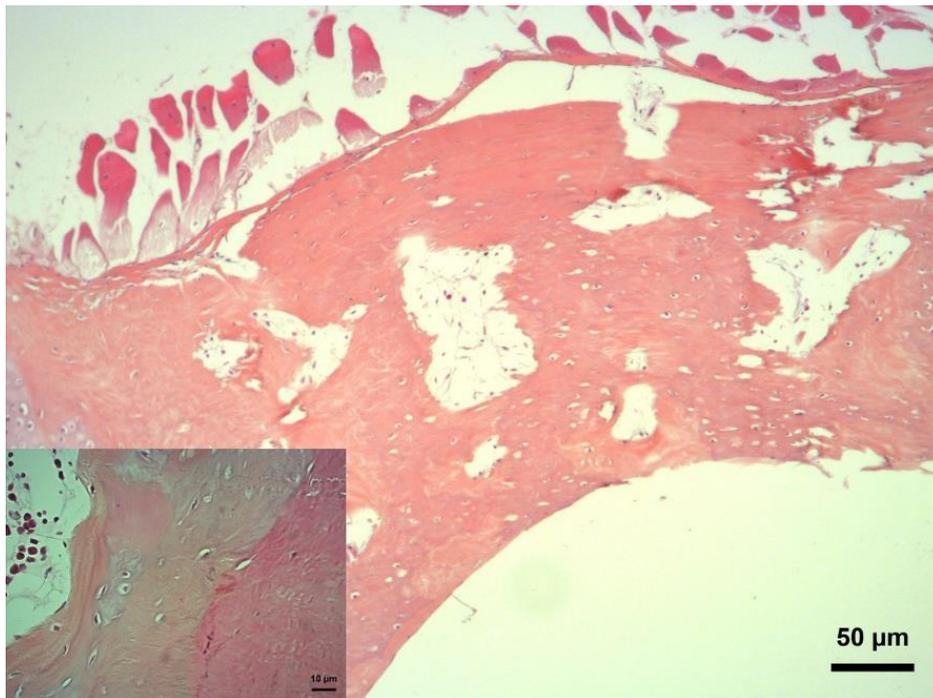


Figura 24. Alteración. Huesos lamelar y esponjoso (H&E). 3773(7)-12. Disminución de osteocitos y canaliculos. 4x. Recuadro: Presencia de osteoblastos, lagunas aumentadas de tamaño sin osteocitos y presencia de canaliculos se encontró baja. 40x.

4.2.3.2 Médula espinal

El tejido normal de médula espinal se encuentra conformado por el cordón espinal, donde se puede apreciar sustancia gris en forma de “H” en la región central y sustancia blanca en región periférica. Además se debe apreciar el canal central (Puelles et.al, 2008).

Mientras que en el grupo de animales en estudio el 40% presentaron irregularidad en tamaño y forma del cordón, conjuntamente con sustancia gris y blanca difusa (Figura 25). En estas alteraciones se observaba un patrón desordenado y disminuido de células nerviosas. En cuanto a canal central se pudo evidenciar deformaciones por el acúmulo de células disminuyendo su diámetro, alteración que se presentó en un 30% de los animales (Figura 26).

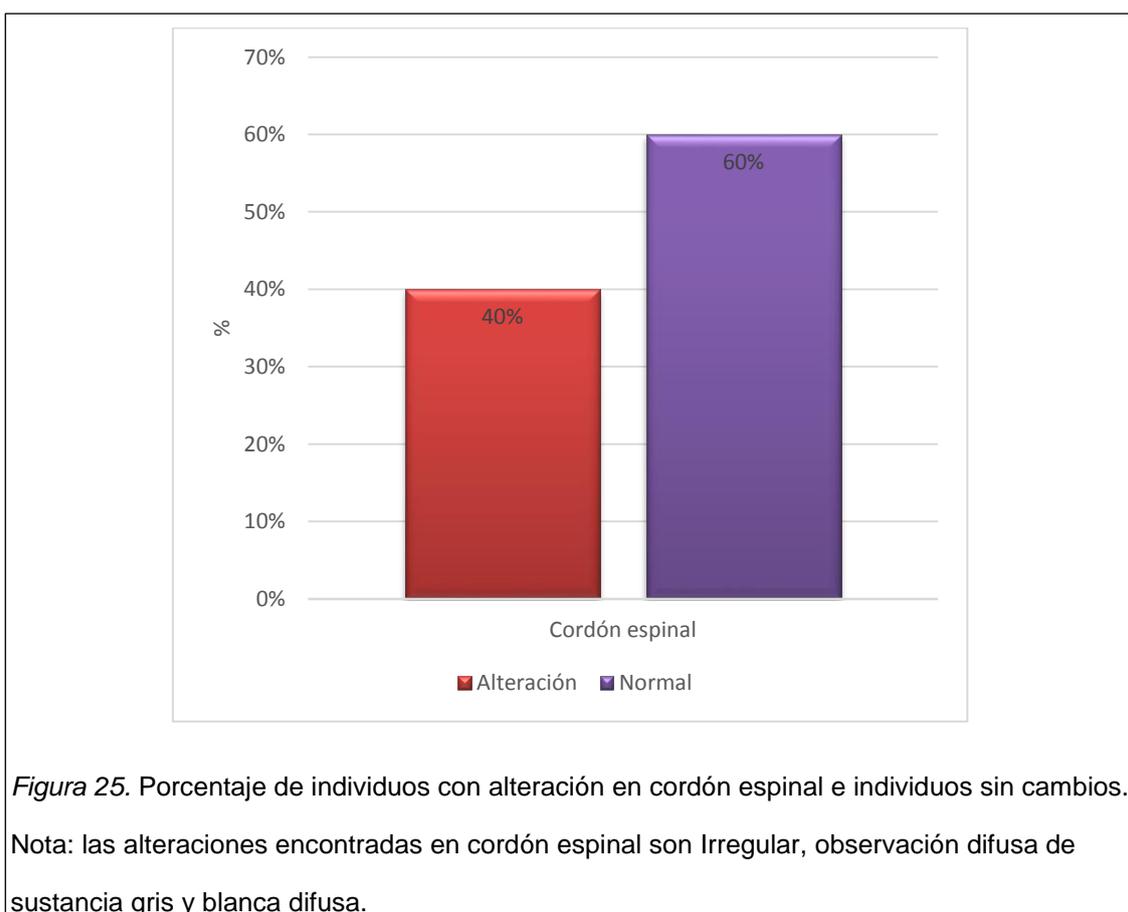


Figura 25. Porcentaje de individuos con alteración en cordón espinal e individuos sin cambios.

Nota: las alteraciones encontradas en cordón espinal son Irregular, observación difusa de sustancia gris y blanca difusa.

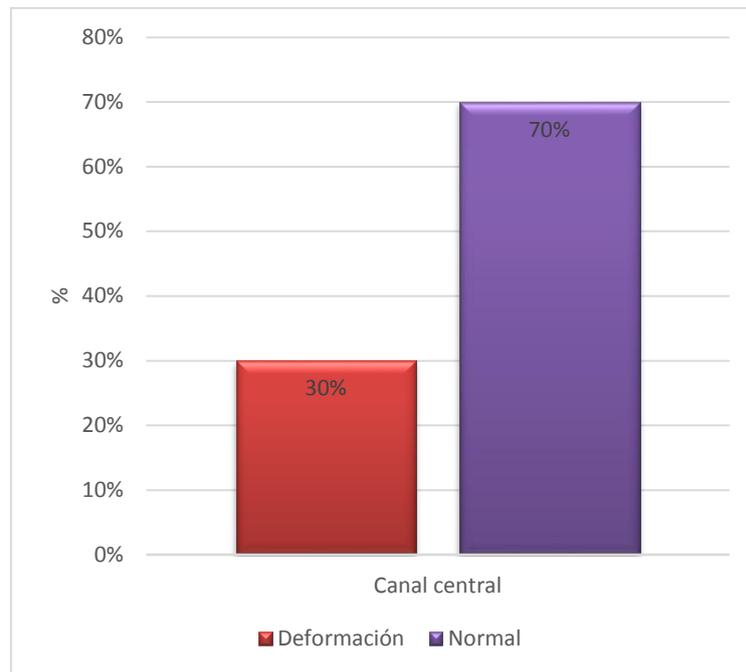


Figura 26. Resultado porcentual de individuos con alteración y sin alteración del canal vertebral. Individuos en estudio (n=10).

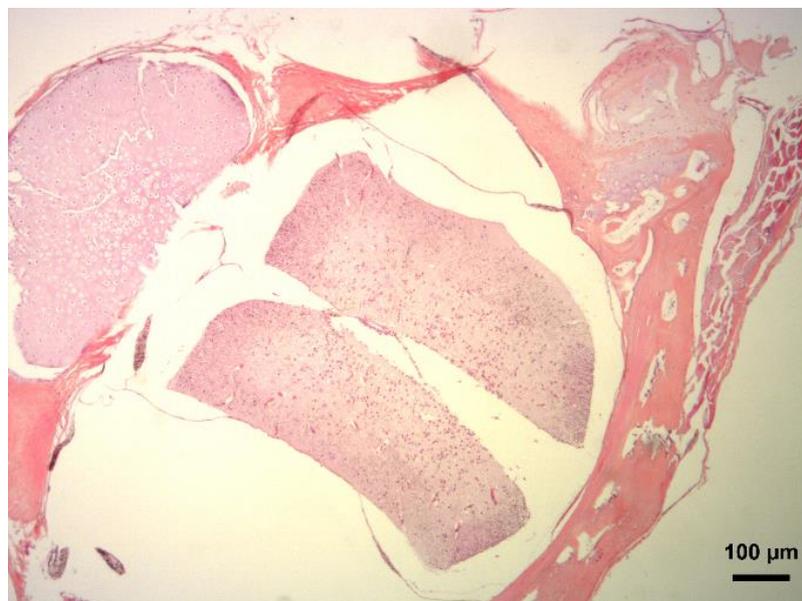
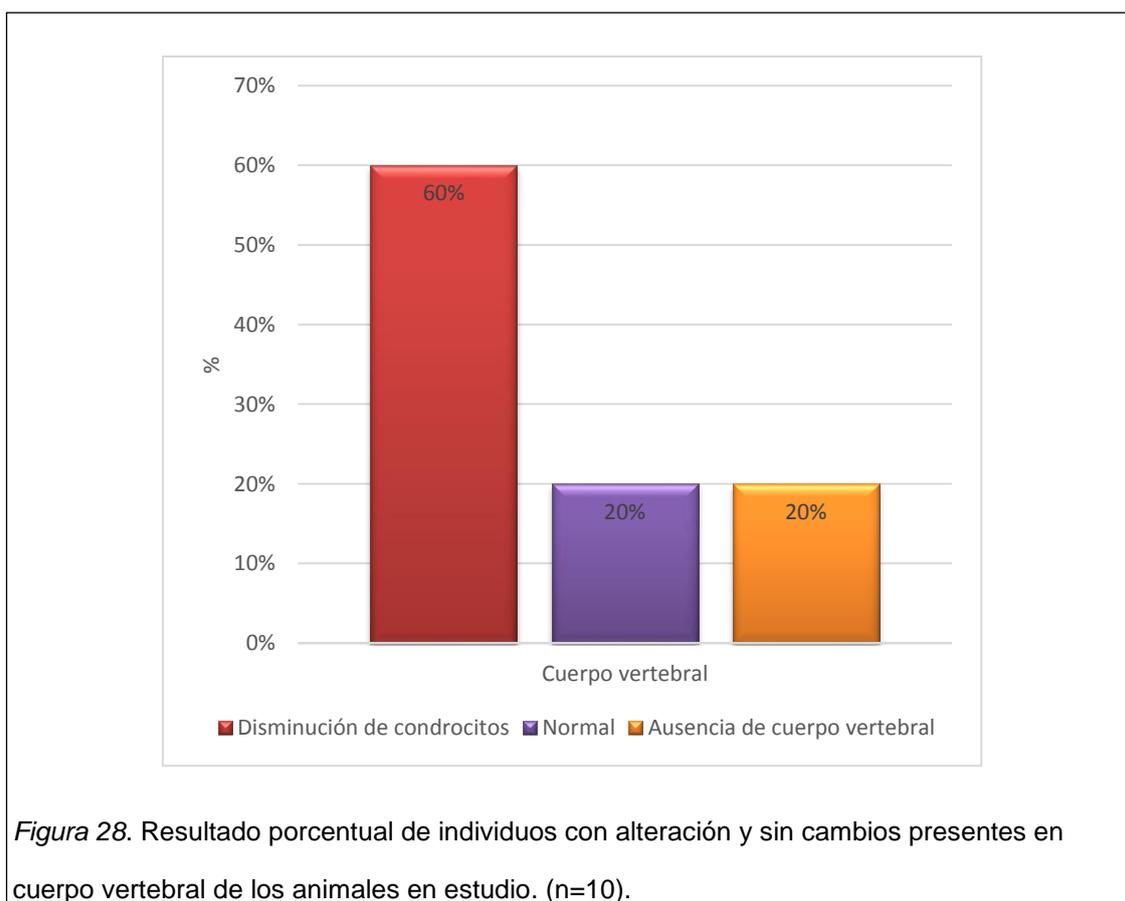


Figura 27. Alteración. Canal espinal y médula espinal (H&E). 3773-2. Médula espinal irregular por compresión, observación de sustancia gris y blanca difusa, canal central presenta deformación. 4x.

4.2.3.3 Cuerpo vertebral

Las alteraciones microscópicas encontradas en cuerpo vertebral fue disminución de condrocitos correspondiente al 60% de individuos (n=6), (Figura 28). Se reportó en dos animales irregularidad en la estructura del cuerpo vertebral y presencia de fibroblastos.

El cuerpo vertebral se encuentra conformado por tejido cartilaginoso hialino cuyas células son los condrocitos diseminadas en lagunas. Aparte se encuentra rodeado por tejido óseo compacto (Pacheco et. al, 2008). Por ende el desarrollo de alteraciones en cuerpo vertebral va generar cambios en morfología y número de células.



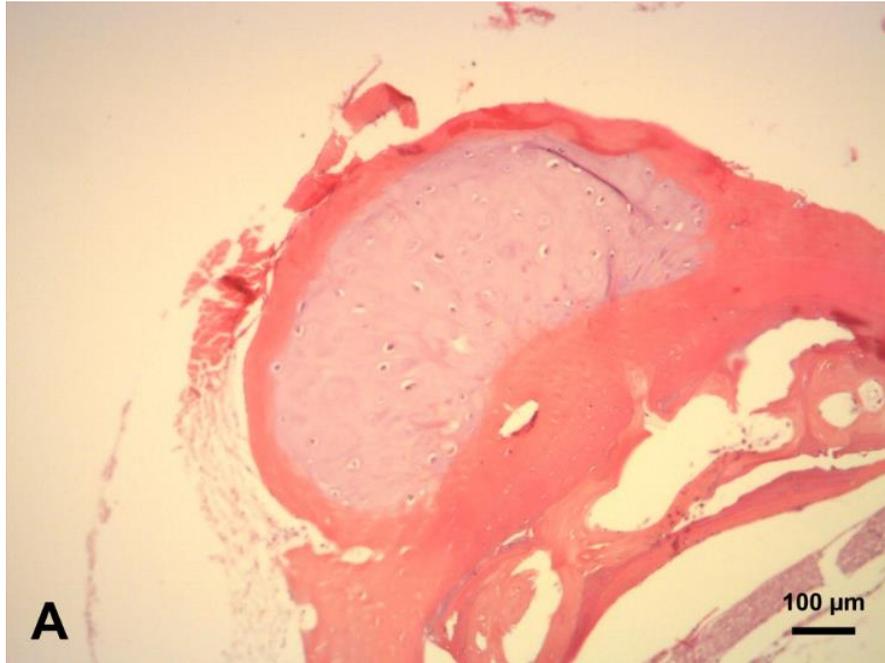


Figura 29. Alteración. Cuerpo vertebral (H&E). 3773(7)-12. A. Disminución de condrocitos en disco intervertebral. 4x.

4.2.3.4 Músculo paraespinal

Los 10 animales en estudio presentaron alteración leve durante la observación microscópica de músculo paraespinal, donde se encontraron levemente degradadas, aumento en endomisio generando separación entre fibras musculares. Como nos indica Nanjun et.al (2016), los cambios presentes en músculo son disminución del diámetro de la fibra muscular y endomisio, aumento del número del núcleo de miocitos.



Figura 30. Músculo paravertebral (H&E). 3773(7)-12. A. Corte transversal: aumento del endomisio. B. Corte sagital: tejido muscular levemente degradado. 40x.

4.2.3.5 Análisis histológico de extremidad

Resultado obtenido del análisis histológico de un individuo que manifestaba engrosamiento de extremidades severa. Presenta marcada deficiencia del hueso trabecular en la epífisis y diáfisis (exceso de resorción), con severa pérdida de canalículos óseos, 4X. Figura 23: Fueron evidentes agrupaciones de condrocitos, con degeneración, rodeados de tejido osteoide no mineralizado, 40x lo que correspondería a osteoporosis epífisis y diáfisis del fémur. En el caso de la diáfisis autores como Orós (2008) atribuye el engrosamiento y deformación de extremidades especialmente de huesos largos a la osteodistrofia fibrosa, desarrollada por un incremento de potasio y disminución de calcio que genera aumento de la parathormona, incrementando la actividad de los osteoclastos. Los procesos disminuyen la densidad de hueso, compensándolo con depósitos de tejido conectivo fibroso, generando deformaciones óseas.

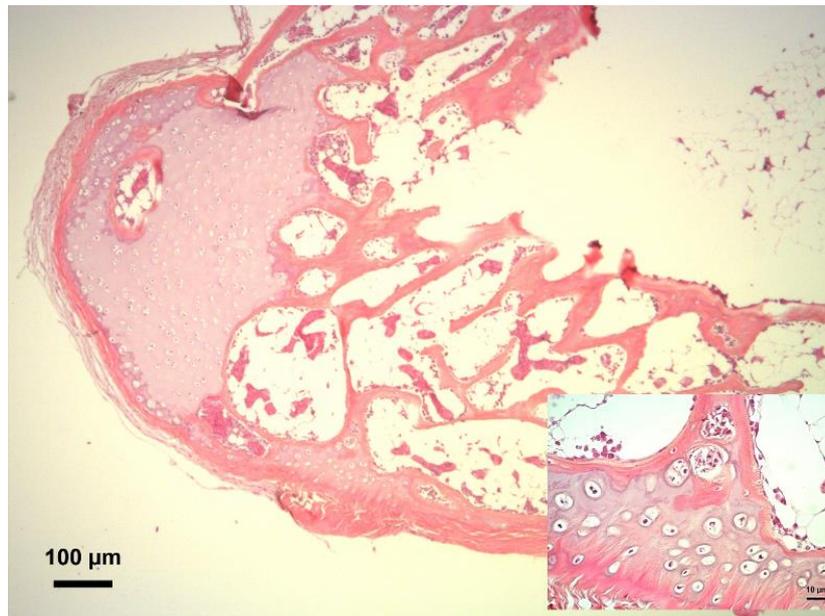


Figura 31. Osteoporosis. Epífisis y diáfisis fémur (H&E). 3764-11.

4.2.4 Hallazgos secundarios

Además el 20% de los animales presentaron alteraciones en riñón, manifestando un aumento de tamaño, coloración pálida con bordes blanquecinos, referente a una insuficiencia renal crónica. Como indica Nelson y Couto, (2010), es común encontrar irregularidad en el tamaño de riñones, procesos de fibrosis y mecanismos de compensación como osteodistrofias, como hallazgos patológicos de una insuficiencia renal crónica.

Todos los resultados obtenidos y analizados se encuentran relacionados con la manifestación de la enfermedad metabólica ósea. Esta relación puede ser debido a las condiciones de cautiverio, alimentación y manejo de los animales que mantiene el centro de Conservación Balsa de los Sapos. Como demuestra Densmore y Earl (2007), las diversas especies de anfibios mantienen un requerimiento nutricional diferente, lo que hace que la mantención en cautiverio de los animales sea difícil. Además, las deficiencias nutricionales están dadas por la alimentación que se mantiene en los centros de conservación,

encontrando que el exoesqueleto que poseen los insectos tienen una deficiencia de calcio; pero factores de iluminación o radiación también influirán en el desarrollo de la enfermedad.

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- En la Balsa de Sapos fue representativo encontrar animales con deformación ósea avanzada y deformación ósea inicial, presentando varias alteraciones que comprometieron la estructura ósea y condición física, que se verificó a través del de los cambios morfológicos, diagnóstico radiográfico y análisis histológicos presentes en los individuos.
- A través del estudio radiográfico se pudo identificar el grado de alteraciones presentes en columna vertebral y extremidades complementando al examen físico realizado en primera instancia, así permitiendo obtener una diagnosis definitiva.
- El análisis histológico fue suplementario a la evaluación física de los individuos y resultados obtenidos en el estudio radiográfico, ya que se evidenció alteraciones a nivel del tejido óseo, presentes en animales con deformación ósea.
- Los diversos estudios realizados y resultados obtenidos en la investigación permitió comprobar que los animales en cautiverio de la Balsa de Sapos desarrollaron enfermedad ósea metabólica, debido a las condiciones de cautiverio y manejo de los animales que se mantienen en el centro de conservación.

RECOMENDACIONES

- Mejorar las condiciones de cautiverio mediante la implementación de luz ultravioleta y horarios para fotoperiodos. Esto permitirá la activación de vitamina D y disminución del desarrollo de la enfermedad metabólica ósea.
- Realizar tratamientos con gluconato de calcio para animales que presenten una deformación ósea avanzada y suplementación de calcio para individuos con deformación ósea inicial como prevención de la enfermedad.
- Realizar estudios bromatológicos para un manejo de alimentación que ayudará a todas las especies que abarca la Balsa de los Sapos.
- Exámenes complementarios como análisis sanguíneo permitirá la valoración de los niveles séricos, brindando la oportunidad de determinar patologías que se encuentren afectando a los animales y así mejorar condiciones de conservación.

REFERENCIAS

- AmphibianWeb Ecuador. (2011). Rayos X. Recuperado el 27 de mayo de 2016 de http://zoologia.puce.edu.ec/gallery/main.php?g2_itemId=26916
- Barragán, K. y Karol, B. (2002). Enfermedades de reptiles y anfibios. *Boletín GEAS*, III(2), 18-27. Recuperado el 27 de abril de 2016 de <http://veterinariosvs.org/redvvs/recursosredvvs/docus/EnfRepAnf.pdf>
- Bertelsen, M. y Crawshaw, G. (2003). Guide to Amphibian Disease. *Exotic*, 5(2), 23-26.
- Cifuentes, M. (2011). Fisiología del Metabolismo de Calcio y Fósforo. Recuperado el 01 de mayo de 2016 de <http://www.dinta.cl/wp-dintacl/wp-content/uploads/Metabolismo-Calcio.pdf>
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D. y Warwick, C. (2011). Recomendaciones para eutanasia de los Animales de Experimentación: Parte 2. Recuperado el 01 de mayo de 2016 de <http://sea.umh.es/files/2011/07/eutanasia2.pdf>
- De Iuliis, G. y Pulera, D. (2011). *The Disecction of Vertebrates*. USA: Elsevier
- Densmore, C. y Earl, D. (2008). *Diseases of amphibians*. Recuperado e 27 de mayo de 2016 de <http://ilarjournal.oxfordjournals.org/content/48/3/235.full#sec-22>
- Mader, D. (2006). *Reptile Medicine and Surgery*. (2ª ed.). Missouri, USA: Elsevier.
- Maneyro, R. y Camargo, A., Da Rosa, I. (2008). Anfibios. Recuperado el 25 de abril de 2016 de http://zvert.fcien.edu.uy/nuevos_cursos/practico_04_anfibios.pdf
- Meza- Joya, F., Ramos, E. y Ramírez, M. (2013). Ontogeny of the Vertebral Column of *Eleutherodactylus johnstonei* (Anura:Eleutherodactylidae) Reveals Heterochronies Relative to Metamorphic Frogs. *The anatomical record*. 296, 1019.–1030. DOI: 10.1002/ar.22705
- Mitchell, M. y Tully, T. (2015). *Current Therapy in Exotic Pet Practice*. St. Louis, Missouri: Elsevier.

- Nanjun, L., Jing, N., Dazhong, W., Jindong, C. y Xueying, L. (2016). Spinal pathomorphological changes in the breeding giantsalamander juveniles. *Zoomorphology*.135: 115-120. DOI 10.1007/s00435-015-0292-5
- Nelson, R. y Couto, C. *Medicina Interna de pequeños animales*. (4ª ed.). Barcelona, España: Elsevier.
- Orós, J. (2008). *Atlas de patología de reptiles*. (1ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica.
- Ortega- Andrade, M., Tobar, C. y Arellano, M. (2011). Tamaño poblacional, uso del hábitat y relaciones interespecíficas de *Agalychnis spurrelli* (anura: hylidae) en un bosque húmedo tropical remanente del noroccidente de Ecuador. Vol.51. N°1. Recuperado el 27 de mayo de 2016 de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0031-10492011000100001
- Ortega-Andrade, H. M. 2008. *Agalychnis spurrelli* Boulenger (Anura: Hylidae): variación, distribución y sinonimia. *Papéis Avulsos de Zoologia* 48:103-117
- Pacheco, M., García, P. y Pombal, M. (2008). Atlas de Histología vegetal y animal. Recuperado el 27 de mayo de 2016 de <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>
- Pessier, A. y Pinkerton M. (2003). *Necropsia practica de anfibios*. California, Estados Unidos: Elsevier.
- Poole, V. y Grow, S. (2009). Guía para el Manejo de Anfibios en Cautiverio, 31.
- Puelles, L., Martínez, S. y Martínez de la Torre M. *Neuroanatomía*. 2008. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Ron, S. R. y Read, M. 2011. *Agalychnis spurrelli*. En: Ron, S. R., Guayasamin, J. M., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A., Ortiz, D. A. y Nicolalde, D. A. 2016. AmphibiaWebEcuador. Version 2016.0.Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. (<http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/FichaEspecie.aspx?Id=1278>)
- Wright, K. y Whitaker, B. (2001). *Amphibian medicine and captive husbandry*. Malabar, Florida: Krieger Publishing Company.

Vargas-Salinas, F. y Torres, O. (2005). *Agalychnis spurrelli*. Catálogo de Anfibios y Reptiles, 1 (1), 19-25.

Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo – Senplades. (2013). Plan Nacional Buen Vivir 2013-2017.pdf.

Universidad de las Américas. (2015). Plan estratégico 2015-2019. Recuperado el 14 de noviembre del 2015 de http://udla.edu.ec/ebooks/plan_estrategico2015-2019/

ANEXOS

Anexo 1. Informe de necropsia

Número de ficha: _____





INFORME DE NECROPSIA.

Identificación: _____ No. Terrario: _____

Fecha de muerte: _____
 Fecha de necropsia: _____
 Nombre común: _____
 Especie: _____ Orden/Familia: _____
 Género (M, F, ND): _____ Edad: _____ Peso: _____
 Distancia boca – cloaca (mm): _____ Circunferencia abdominal-miembros: _____
 Muerte (natural o eutanasia): _____ Eutanasia (física – química): _____
 Grado de descomposición (alto, mediano, bajo): _____

Condiciones del terrario:

 Temperatura del terrario: _____ Humedad relativa del terrario: _____

Historia (enfermo, bajo mantenimiento, etc):

Condición general (Piel, mucosas, condición corporal, reflejos nerviosos):

Sistema musculoesquelético:

Sistema cardiovascular:

Sistema respiratorio:

Continuación de Anexo 1.

Número de ficha: _____

Sistema digestivo:

Sistema urinario:

Sistema endocrino:

Órganos de los sentidos:

Muestras para histopatología:

Muestras para otros estudios:

Diagnósticos morfológicos:

Comentarios adicionales:

Responsable: _____ Disposición del cadáver: _____

Anexo 2. Equipo radiográfico de la Facultad de Biología de la PUCE.

