



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD



“CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y CITOLÓGICA DEL LÍQUIDO
DE EDEMA EN ANFIBIOS DE LA ESPECIE GASTROTHERCA spp.
PROVENIENTES DE CAUTIVERIO DE LA Balsa de SAPOS.”



AUTOR

Anahí Oleas Paz

AÑO

2018



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

“CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y CITOLÓGICA DEL LÍQUIDO DE
EDEMA EN ANFIBIOS DE LA ESPECIE *GASTROTHECA* spp.
PROVENIENTES DE CAUTIVERIO DE LA Balsa de Saños.”

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Médico Veterinario Zootecnista

Profesor guía

Alexander Genoy-Puerto

Autora

Anahí Oleas Paz

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Caracterización microbiológica y citológica del líquido de edema en anfibios de la especie *Gastrotheca* spp. provenientes de cautiverio de la Balsa de Sapos, a través de reuniones periódicas con la estudiante Anahí Oleas Paz, en el semestre 2018-1, 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”

Elmer Alexander Genoy-Puerto

Médico Veterinario

CI.1757589278

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber dirigido el trabajo, Caracterización microbiológica y citológica del líquido de edema en anfibios de la especie *Gastrotheca* spp. provenientes de cautiverio de la Balsa de Sapos, de la estudiante Anahí Oleas Paz, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

José Miguel Álvarez Suarez

Ph.D. Alimentación y Salud

CI. 1756653327

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es 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”

Anahí Oleas Paz

CI. 1720751898

AGRADECIMIENTOS

A todas las instituciones y personas que colaboraron con la realización de este trabajo, entre ellos a Alexander Genoy, Andrés Merino y Freddy Almeida. Un agradecimiento especial a Mairita Rojas y Anita Santamaria por guiarme y a Gina e Isabelita por tanta bondad.

A mi mamá, Sara María, por enseñarme que rendirse nunca es una opción y a mi papá, Ángel, por enseñarme que el conocimiento está en cualquier rincón. Gracias por su ejemplo y por ser los mejores padres.

A mi hermana Paula, gracias por compartir conmigo y escucharme, y a mi Dito, gracias por todo el cariño y consejos. A mi tía Nora, mujer de ciencia, por ser un gran ejemplo y por apoyarme.

A Erick, gracias por creer en mí y por pintarme la vida de hermosos colores.

A Michelle Paucar, por tolerar a los saltamontes durante el muestreo, por ayudarme y por tantas risas compartidas durante este proceso.

Y a mis amigos, especialmente a Karla Bucheli y Carla Muñoz, por hacer de estos años universitarios algo que atesoraré por siempre.

DEDICATORIA

A mi abuelita Emmita, quien con su dulce nombre me enseñó a hablar, leer y escribir.

Y a Kyara.

RESUMEN

Existe una alta prevalencia de edema en ranas de cautiverio, incluyendo individuos endémicos del Ecuador del género *Gastrotheca*, los cuales presentan diferentes grados de extinción. A pesar de ello, existen pocas investigaciones que determinan la causa de este síndrome, esto se da por la dificultad de diagnóstico y falta de pruebas específicas para estos animales. En la Balsa de Sapos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador se identificaron 41 individuos del género *Gastrotheca* que presentan síndrome de edema. El objetivo del presente estudio fue caracterizar a nivel microbiológico, citológico y fisicoquímico el líquido proveniente de edema de ranas del género *Gastrotheca* spp. de la Balsa de Sapos, para determinar posibles patógenos presentes. Para lo cual se determinó la presencia microbiológica e identificó los patógenos presentes, principales componentes bioquímicos y citológicos y se determinó las diferencias de composición entre machos y hembras. Se muestrearon diez individuos machos y diez hembras con edema, provenientes de dicha institución. Se tomó las medidas morfométricas y se extrajo el líquido de edema mediante punción en la región para-medial o para-lumbar. La muestra del líquido fue dividida en tercios, el primero para el análisis microbiológico (aislamiento bacteriano e identificación taxonómica), el segundo para el análisis citológico (conteo celular y clasificación del tipo de líquido) y el tercero para el análisis fisicoquímico (color, aspecto, densidad y pH). A la caracterización microbiológica se identificaron 14 tipos de bacterias en el líquido de edema, las cuales fueron identificadas como propias de infección bacteriana secundaria. A su vez, las células identificadas con mayor frecuencia fueron linfocitos con el 60,1%, eritrocitos con el 29,3% y neutrófilos con el 4,54%. Las pruebas de caracterización citológica y fisicoquímica dieron como resultado que las muestras de líquido de edema fueron el 35% exudado no séptico, el 40% exudado séptico y el 25% restante trasudado. Por último, no se encontró una relación entre los datos obtenidos y el sexo de los individuos estudiados. Los datos obtenidos deben ser analizados en conjunto con otras pruebas de laboratorio para tener un diagnóstico más certero de la causa de edema en los animales estudiados.

ABSTRACT

There is a high prevalence of edema in captive frogs, including individuals endemic to Ecuador of the genus *Gastrotheca*, which present different degrees of extinction. Despite this, there is little research that determines the cause of this syndrome, this is due to the difficulty of diagnosis and lack of specific tests for these animals. In the Balsa de Sapos of the Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 41 individuals of the genus *Gastrotheca* were identified who present edema syndrome. The objective of the present study was to characterize at the microbiological, cytological and physicochemical levels the liquid coming from edema of frogs of the genus *Gastrotheca* spp. of the Balsa de Sapos, to determine possible pathogens present. For which the microbiological presence was determined and identified the pathogens present, main biochemical and cytological components and the composition differences between males and females were determined. Ten males and ten females with edema were sampled from that institution. Morphometric measurements were taken and edema fluid was removed by puncture in the para-medial or para-lumbar region. The liquid sample was divided into thirds, the first for the microbiological analysis (bacterial isolation and taxonomic identification), the second for the cytological analysis (cell count and liquid type classification) and the third for the physicochemical analysis (color, appearance, density and pH). A microbiological characterization identified 14 types of bacteria in the edema fluid, which were identified as secondary bacterial infection. In turn, the most frequently identified cells were lymphocytes with 60.1%, erythrocytes with 29.3% and neutrophils with 4.54%. The cytological and physicochemical characterization tests showed that the swelling fluid samples were 35% non-septic exudate, 40% septic exudate and the remaining 25% transudate. Finally, no relationship was found between the data obtained and the sex of the individuals studied. The data obtained should be analyzed in conjunction with other laboratory tests to have a more accurate diagnosis of the cause of edema in the animals studied.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo General	3
1.1.2 Objetivos específicos	3
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	4
2.1 Características de las especies <i>Gastrotheca</i> spp.	4
2.1.1 <i>Gastrotheca</i> spp.....	4
2.1.1.1 Taxonomía	4
2.1.1.2 Distribución	5
2.1.1.1 Descripción	6
2.1.1.2 Situación Actual	7
2.2 Fisiología del intercambio líquido de las ranas	8
2.3 Síndrome de edema	9
2.3.1 Etiología	9
2.3.2 Patogenia.....	10
2.3.3 Prevalencia	10
2.3.4 Factores de riesgo	10
2.3.5 Manifestaciones clínicas	10
2.3.6 Diagnóstico	11
2.3.7 Tratamiento y prevención.....	11
2.4 Pruebas de laboratorio.....	11
2.4.1 Características macroscópicas del líquido	12
2.4.2 Microscopía de campo claro	12

2.4.2.1	Tinción eosina hematoxilina.....	13
2.4.2.2	Componentes celulares sanguíneos.....	13
2.4.2.2.1	Eritrocitos.....	13
2.4.2.2.2	Leucocitos.....	14
2.4.2.2.3	Trombocitos.....	14
2.4.3	Cultivo bacteriano <i>in vitro</i> con medio enriquecido.....	14
2.4.4	Tinción diferencial Gram.....	15
2.4.5	Prueba de catalasa.....	15
2.4.6	Prueba de oxidasa.....	16
2.4.7	Microgen STREPT ID.....	16
2.4.8	Bilis esculina.....	17
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....		18
3.1	Ubicación.....	18
3.2	Población y muestra.....	18
3.3	Materiales.....	19
3.4	Metodología.....	21
3.5	Diseño experimental.....	23
3.5.1	Variables.....	23
3.5.2	Hipótesis.....	24
3.5.2.1	Hipótesis del estudio.....	24
3.5.2.2	Hipótesis estadística.....	24
3.5.3	Diseño experimental.....	24
3.5.4	Análisis estadístico.....	25
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		26
4.1	Diagnóstico situacional.....	26

4.2	Resultados	26
4.2.1	Caracterización microbiológica	27
4.2.2	Caracterización citológica	29
4.2.3	Caracterización fisicoquímica	32
4.2.4	Estadística inferencial	35
4.2.5	Hallazgos anatómicos macroscópicos	39
4.2.5.1	Grado de edema y patologías presentes	39
4.2.5.2	Medidas morfométricas.....	40
4.3	Discusión.....	41
4.4	Limitantes.....	49
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		50
5.1	Conclusiones.....	50
5.2	Recomendaciones	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		54
ANEXOS.....		60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Taxonomía del género <i>Gastrotheca</i>	5
Tabla 2: Ubicación altitudinal de las especies estudiadas con relación a las regiones del Ecuador	6
Tabla 3: Información del estado de las especies de acuerdo con la Lista Roja de especies amenazadas de la IUCN	7
Tabla 4: Materiales para procedimientos de laboratorio y su cantidad según la etapa de identificación	19
Tabla 5: Matriz de variables.	23
Tabla 6: Bacterias identificadas, número de muestras en las que están presentes y el porcentaje con relación a las muestras con crecimiento bacteriano positivo	28
Tabla 7: Valores promedio de la serie eritrocitaria y leucocitaria de líquido de edema de 20 individuos del género <i>Gastrotheca</i>	29
Tabla 8: Resultados estadísticos obtenidos de la relación entre el sexo del individuo y las diferentes células encontradas	38
Tabla 9: Patologías observadas en los individuos con edema	40
Tabla 10: Medidas morfométricas de los animales de estudio	41

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Individuos del género <i>Gastrotheca</i>	6
<i>Figura 2.</i> Mapa conceptual de las pruebas de identificación microbiológica utilizadas en el estudio.	22
<i>Figura 3.</i> Esquema del diseño experimental.	24
<i>Figura 4.</i> Morfología bacteriana observada mediante tinción Gram.	27
<i>Figura 5.</i> Crecimiento bacteriano con relación al sexo de los individuos.	27
<i>Figura 6.</i> Relación entre el porcentaje de eritrocitos y linfocitos con el sexo del individuo.	30
<i>Figura 7.</i> Morfología celular observada.	30
<i>Figura 8.</i> Heterófilo con vacuolas de fagocitación.	31
<i>Figura 9.</i> Componentes acidofílicos y basofílicos observados.	31
<i>Figura 10.</i> Presencia de elementos basofílicos y acidofílicos encontrados en el líquido de edema.	32
<i>Figura 11.</i> Coloración del líquido de edema.	32
<i>Figura 12.</i> Aspecto de la muestra con relación al sexo de los individuos.....	33
<i>Figura 13.</i> Distribución de los datos de densidad del líquido con relación al sexo de los individuos.	34
<i>Figura 14.</i> Clasificación del tipo de líquido con relación al sexo de los individuos	34
<i>Figura 15.</i> Diagrama de dispersión que relaciona la variable Densidad hembras (g/dl) con la variable Peso hembras (g).....	35
<i>Figura 16.</i> Diagrama de dispersión que relaciona la variable Densidad machos (g/dl) con la variable Peso machos (g).....	36
<i>Figura 17.</i> Diagrama de dispersión que relaciona la variable Densidad hembras (g/dl) con la variable Circunferencia abdominal hembras (mm).	37
<i>Figura 18.</i> Diagrama de dispersión que relaciona la variable Densidad machos (g/dl) con la variable Circunferencia abdominal machos (mm).	38
<i>Figura 19.</i> Observación macroscópica de las enfermedades presentes en los animales estudiados.	40

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Los anfibios cumplen un papel ecológico vital, ya que son catalogados como bioindicadores del estado del medio en el que habitan. Estos animales están distribuidos en ecosistemas naturales a nivel mundial. Sin embargo, actualmente se registra un marcado declive de las poblaciones de anfibios (IUCN, 2017).

El Ecuador es uno de los países que afronta un descenso poblacional de anfibios, encontrándose en el tercer puesto del ranking de países con mayor cantidad de anfibios amenazados y, a su vez, se encuentra entre las cinco regiones tropicales andinas con mayor diversidad de anfibios (Angulo, Rueda-Almonacid, Rodríguez-Mahecha y La Marca, 2006). Esto hace que la conservación de anfibios en el Ecuador sea fundamental.

Para mitigara dicha disminución poblacional se ha desarrollado proyectos de conservación que fomentan la reproducción *in situ* de anfibios en peligro de extinción, para su posterior reintroducción al hábitat natural. El gran número de especies de anfibios en cautiverio, a su vez, ha impulsado a la realización de estudios científicos acerca de su correcto manejo en cautiverio (Pessier y Pinkerton, 2003).

A pesar de la basta información sobre el cuidado de anfibios en cautiverio, se conoce muy poco acerca de los métodos de diagnóstico y tratamiento para nuevas enfermedades de origen viral y bacteriano. Dichas patologías afectan a individuos de colecciones a nivel mundial, por lo que es necesario diagnosticarlas mediante métodos de caracterización patológica (Pessier y Pinkerton, 2003).

El síndrome de edema es una de aquellas enfermedades. Afecta a innumerables especies de anfibios y tiene una alta prevalencia en las ranas que viven en cautiverio. Para determinar las características patogénicas del síndrome de edema es necesario realizar técnicas de laboratorio que permitan caracterizar el líquido que compone al edema (Wright y Whitaker, 2001).

El cultivo *in vitro* es una de las técnicas más significativas, ya que las infecciones bacterianas están relacionadas con problemas cutáneos en anfibios y suelen convertirse en problemas sistemáticos. La mayoría de enfermedades bacterianas son causadas por bacterias Gram negativas y micobacterias (Pessier, 2002; Vaughan, Vitali, Payne y Eden, 2006).

De igual forma, el análisis del líquido de edema que incluya conteo celular, proteína total y examinación citológica aporta información acerca del estado del individuo y el origen de la enfermedad (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2013; Pessier, 2007).

Los resultados de la caracterización del líquido de edema dictaminan la posible causa de la patología. Gracias a esto se puede escoger un plan terapéutico apropiado para los anfibios que presentan síndrome de edema, y de esta forma preservar las condiciones óptimas de vida de los individuos en cautiverio (Pessier, 2009).

El estudio a continuación caracteriza de forma microbiológica y citológica el líquido de edema de individuos del género *Gastrotheca*, pertenecientes al proyecto de conservación de anfibios “Balsa de Sapos” de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Dichos animales son endémicos del Ecuador y poseen diferentes grados de posible extinción (IUCN, 2017). Debido a ello, es crucial la determinación correcta de la causa del síndrome de edema (Cecil, 2006).

Mediante este estudio se busca ayudar a mejorar el manejo sanitario de los animales en esta institución. También, aportar con información para la creación de planes de manejo sanitario en instituciones de conservación y es tesis pionera a nivel de medicina y patología de anfibios en el Ecuador.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

Caracterizar a nivel microbiológico, citológico y fisicoquímico el líquido proveniente de edema de ranas del género *Gastrotheca* spp. de la Balsa de Sapos, para determinar posibles patógenos presentes.

1.1.2 Objetivos específicos

Identificar microorganismos presentes en el líquido proveniente de edema, mediante el aislamiento en medios de cultivos y pruebas bioquímicas que permitan su caracterización taxonómica.

Determinar y cuantificar las principales propiedades físicas, químicas y citológicas del líquido de edema.

Determinar, mediante pruebas estadísticas, si existen diferencias en cuanto a composición microbiológica y citológica del edema entre individuos machos y hembras.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Características de las especies *Gastrotheca* spp.

Para caracterizar patologías mediante pruebas diagnósticas, es necesario conocer las particularidades de la especie a estudiar. En base a esto, se puede conocer el estado actual de la especie y generar acciones para controlar posibles problemas como la extinción (Curtis, Barnes, Schneker y Massarini, 2008).

2.1.1 *Gastrotheca* spp.

Los individuos del género *Gastrotheca* son de hábitos nocturnos y su alimentación es insectívora. Habitan en aguas estancadas estáticas, bosque intervenidos, áreas abiertas y vegetación ribereña (Valencia, Toral, Morales, Betancour y Barahona, 2008). La característica física más notable es que la hembra posee un marsupio en el que transporta los embriones después de la fecundación (Valencia y Garzón, 2011).

2.1.1.1 Taxonomía

Existen alrededor de 67 especies que pertenecen al género *Gastrotheca*, sin embargo, hay registros que demuestran diferentes denominaciones para la misma especie, siendo en total 77 nombres (Duellman, 2015). La taxonomía del género *Gastrotheca* se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1

Taxonomía del género Gastrotheca

Taxonomía			
Reino:	<i>Animalia</i>	Orden:	<i>Anuros</i>
Phylum:	<i>Cordados</i>	Suborden:	<i>Neobatrachia</i>
Subphylum:	<i>Vertebrado</i>	Familia:	<i>Hemiphractidae</i>
Superclase:	<i>Tetrápoda</i>	Género:	<i>Gastrotheca</i>
Clase:	<i>Anfibios</i>	Especies:	<i>G. pseustes</i> <i>G. riobambae</i> <i>G. litonedis</i>

Adaptada de Duellman, 2015; Fowler, 1913.

Las especies que formaron parte del estudio fueron *G. pseustes* (nombre común: Rana Marsupial de San Lucas), *G. riobambae* (nombre común: Rana Marsupial Andina) y *G. litonedis* (nombre común: Rana Marsupial de Azuay) (Valencia et al., 2008).

2.1.1.2 Distribución

Las especies que pertenecen al género *Gastrotheca* se distribuyen a lo largo de la Cordillera de los Andes, desde el norte de Argentina hasta Venezuela y al este de Brasil y Panamá (Duellman y Hillis, 1987).

La ubicación altitudinal de *G. pseustes*, *G. riobambae* y *G. litonedis* se observa en la Tabla 2. Las altitudes corresponden a los siguientes pisos altitudinales: Tropical de 0 a 1000msnm (T), Subtropical de 1000 a 2000 msnm (S), Templado de 2000 a 3000 msnm (t) y Altoandino de 3000 a 4800 msnm. Se debe mencionar que algunas de las especies se distribuyen en regiones del piso altitudinal, mas no la totalidad del mismo (Coloma, 1991; Valencia et al., 2008).

Tabla 2

Ubicación altitudinal de las especies estudiadas con relación a las regiones del Ecuador

Especie	Costa		Sierra			Oriente	
	T	S	t	A	t	S	T
<i>Gastrotheca pseustes</i>			x	x	x		
<i>Gastrotheca riobambae</i>			x	x	x		
<i>Gastrotheca litonedis</i>		x	x	x	x		

Nota. T=Tropical, S=Subtropical, t=Temperado y A=Altoandino. Adaptada de Coloma, 1991.

El rango altitudinal de su hábitat depende de cada especie, *G. litonedis* habita entre 2750 a 2854 msnm, *G. riobambae* habita entre 1800 a 3220 msnm y *G. pseustes* habita entre 2200 a 4080 msnm (Ron et al., 2016). La distribución geográfica, en el Ecuador, de las tres especies mencionadas se puede observar en el Anexo 1.

2.1.1.1 Descripción

Las ranas que pertenecen al género *Gastrotheca* son medianas, con dorso de color marrón o verde, que puede presentar rayas o manchas de color oliva, como se observa en la Figura 1. De cuerpo robusto con cabeza ancha, los machos miden aproximadamente 56,8 mm y las hembras 66,4mm (Ron et al., 2016).



Figura 1. Individuos del género *Gastrotheca*. De izquierda a derecha se observa: *G. litonedis*, *G. riobambae* y *G. pseustes*. Tomada de Ron et al., 2016.

En cuanto a los rasgos característicos de cada una de las especies estudiadas, los individuos *G. pseustes* poseen una franja clara a nivel de la boca y coloración dorada a nivel de las parótidas. Por otro lado, el dorso de los individuos *G. riobambae* es de color café o verde con diseños variables. El rasgo característico de los individuos *G. litonedis* son las franjas longitudinales de color verde a café junto a una banda delgada dorada en el lomo (Valencia et al., 2008).

2.1.1.2 Situación Actual

En Ecuador existen 16 especies del género *Gastrotheca*, de las cuales 10 (62,5%) se encuentran bajo amenaza de extinción, cinco de ellas son endémicas. La reducción del hábitat, cambio climático y enfermedades emergentes, son varias de las amenazas que causan extinción (Duellman, 2015; Ron, 2008).

En el caso de las especies *G. pseustes*, *G. riobambae* y *G. litonedis*, La Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUNC especifica el estado de conservación de cada una ellas y las amenazas que causan el declive de las poblaciones. (Tabla 3).

Tabla 3

Información del estado de las especies de acuerdo con la Lista Roja de especies amenazadas de la IUCN

Especie	Categoría	Criterio
<i>G. pseustes</i>	En peligro de extinción	Disminución drástica de la población, más del 50% en las últimas tres generaciones
<i>G. riobambae</i>	En peligro de extinción	Disminución drástica de la población, más del 50% en las últimas tres generaciones
<i>G. litonedis</i>	En peligro de extinción	Distribución severamente fragmentada, y disminución continua del número de individuos maduros

Adaptado de IUCN, 2017.

De acuerdo a dicha lista, la causa principal de la disminución de la población de *G. pseustes* es la Quitridiomycosis (Coloma, Ron, Morales y Almeida, 2004b). En cuanto a la población de *G. riobambae*, la pérdida de hábitat y la contaminación del agua son los causantes de su disminución (Coloma, Ron, Morales y Almeida, 2004c; Duellman, 2015).

En el caso de la población de *G. litonedis*, no se conoce la causa exacta de su disminución, se necesita reevaluar las posibles amenazas (Coloma, Ron, Morales y Almeida, 2004a; Duellman, 2015).

2.2 Fisiología del intercambio líquido de las ranas

La fisiología del intercambio de líquido en anuros depende de las características anatómicas propias de cada especie. Generalmente, se compone del proceso de absorción y almacenamiento de agua, función renal y proceso de absorción de electrolitos (Pessier, 2009).

La mayoría de anfibios no ingieren agua, en vez de ello la absorben a través de la piel. En anuros terrestres, la piel de la zona abdominal ventral posee mayor irrigación sanguínea, lo que favorece la absorción de agua. Este mecanismo de absorción es controlado por la hormona arginina vasopresina secretada por la neurohipófisis (Pessier, 2009).

En casos de deshidratación, esta hormona, aumenta la permeabilidad osmótica de la piel y vejiga. El agua absorbida por la piel es almacenada en la vejiga, formando una reserva de agua que mantiene la concentración osmótica de líquido en el organismo (Pessier, 2009).

En cuanto a la función renal, los anfibios poseen una alta tasa de filtración glomerular. Sin embargo, esta puede disminuir rápidamente debido a deshidratación y retención de residuos nitrogenados. Estos animales no pueden concentrar la orina y absorber activamente una gran cantidad de solutos desde los tubos renales y la vejiga (Pessier, 2009).

Dentro de los solutos que participan en el intercambio líquido, se encuentran el sodio y el cloro. Ambos electrolitos son transportados a través de la piel por bombas de transporte activo unidas a las membranas de las células epiteliales cutáneas. Este proceso puede verse afectado por cambios en el pH del ambiente, menor a cinco (Pessier, 2009).

2.3 Síndrome de edema

La importancia del conocimiento acerca del síndrome de edema en ranas radica en su alta incidencia en cautiverio, variable etiología, patogenia y factores de riesgo (Pessier, 2009).

2.3.1 Etiología

El síndrome de edema en ranas es una enfermedad idiopática, que puede o no estar asociada a la presencia de septicemia bacteriana, parasitismo, déficit alimenticio, infecciones virales, falla renal, cardíaca, linfática o hepática, entre otros (Wright y Whitaker, 2001).

En el caso de no presentar afecciones bacterianas, víricas o parasitarias; se considera como causa la ruptura de capilares y vasos linfáticos, que comprometen el regreso de líquido intestinal al sistema circulatorio. De igual forma, puede ser causado por la disrupción de la integridad de la piel, resultando en un aumento de ingreso de agua (Wright y Whitaker, 2001).

Para determinar la presencia de septicemia bacteriana se debe tener en cuenta que las bacterias que pueden causar síndrome de edema en ranas son variadas. Las bacterias Gram positivas han sido rara vez mencionadas como promotoras de enfermedades en anfibios, pero es necesario considerarlas si se realizan estudio de líquido celómico (Aguilar, Hernández, Divers y Perpiñan, 2010).

Las bacterias Gram negativas, al contrario de las Gram positivas, son causantes de la mayoría de las infecciones bacterianas en anfibios. Dentro de este grupo de patógenos están: *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Alcaligenes* y *Enterobacter*, entre otros (Aguilar et al., 2010).

2.3.2 Patogenia

Debido a que el síndrome de edema es una enfermedad causada por varios agentes, la patogenia es variada. Sin embargo, los resultados finales de la patología son: un déficit en la regulación de la osmolaridad del organismo, aumento de la absorción y retención de líquido y almacenamiento en la cavidad celómica y en el espacio subcutáneo (Wright y Whitaker, 2001).

2.3.3 Prevalencia

La prevalencia de esta enfermedad es desconocida, debido a la falta de investigación y el escaso registro del número de individuos que presentan síndrome de edema en colecciones en cautiverio (Pessier, 2009).

2.3.4 Factores de riesgo

Los factores de riesgo se derivan de las condiciones ambientales pobres y del mal manejo en cautiverio, ya que el síndrome de edema es una enfermedad idiopática que puede derivarse de la deficiente calidad de agua, contaminación bacteriana, viral y parasitaria por parte del personal, nuevos ingresos de animales, material orgánico y otros (Wright y Whitaker, 2001).

2.3.5 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas más representativas del síndrome de edema en anfibios son la presencia de hidroceloma (aumento del contenido líquido propio de la cavidad celómica), celoma distendido, espacios subcutáneos saturados de líquido (en especial en las zonas del submaxilar y extremidades) y aumento excesivo de peso debido al exceso de líquido (Aguilar et al., 2010).

El grado de edema se clasifica de acuerdo con el peso del individuo. Si se observa un aumento triplicado del peso normal se considera que el grado de edema es severo. Si el peso se encuentra duplicado, el grado de edema es moderado y si el aumento de peso no supera el doble del peso normal, se considera grado de edema leve (Aguilar et al., 2010).

2.3.6 Diagnóstico

Para diagnosticar el síndrome de edema es necesario descartar la presencia de dermatitis y septicemia. Para lo cual se realiza pruebas de laboratorio como el cultivo bacteriano del líquido de la cavidad celómica y espacio subcutáneo (Aguilar et al., 2010; Wright y Whitaker, 2001).

2.3.7 Tratamiento y prevención

Para tratar la sobrecarga de agua, se realizan baños con soluciones de osmolaridad alta, como solución salina al 0,8-1,0% o solución de Ringer Lactato para anfibios ligeramente hipertónica; 6,6 g de Cloruro de sodio disueltos en 900ml de agua destilada (Aguilar et al., 2010).

Para la prevención se debe tener en cuenta las condiciones óptimas del agua con la que se hidrata al animal, realizar pruebas periódicas para monitorear los componentes de la misma y evitar el uso de desinfectantes tóxicos para la piel de estos animales (Pessier, 2009).

2.4 Pruebas de laboratorio

La literatura describe varios procedimientos de laboratorio para identificar los componentes biológicos, bioquímicos y citológicos de un líquido. Dentro de los cuales están las técnicas macroscópicas, microscópicas, cultivo *in vitro* y pruebas de diferenciación bacteriana (Murray et al., 2013).

2.4.1 Características macroscópicas del líquido

A través de la caracterización macroscópica, se puede clasificar el líquido en exudado o trasudado. Se considera exudado a un líquido que presenta elementos propios de un proceso inflamatorio, el cual se encuentra depositado en el intersticio. Mientras que el trasudado es un líquido extravascular que no presenta componentes inflamatorios, siendo menos rico en células y proteínas que el exudado (Campos, Grajales, López, Morales y Yepes, 2011).

Para determinar si el líquido es exudado o trasudado, es necesario conocer las siguientes características de la muestra: color, densidad, aspecto, pH y presencia de células. La presencia bacteriana en la muestra determina si el líquido es séptico o no. Esto permite conocer la naturaleza del líquido y su posible causa (Ochoa, Roque y Daza, 2012).

La coloración y aspecto del líquido se conoce mediante observación directa, mientras que la densidad puede ser medida mediante el uso de refractómetro. Para conocer el pH del líquido, la técnica más utilizada es la lectura de pH mediante tiras reactivas (Villier y Blackwood, 2013).

2.4.2 Microscopía de campo claro

La microscopía de campo claro es una prueba de laboratorio que permite examinar una muestra de fluido mediante la utilización de reactivos y la luz del microscopio bajo un aumento determinado. La determinación de los componentes microscópicos de un fluido brinda información básica sobre sus características sépticas (Wright y Whitaker, 2001).

El aumento depende del objetivo de la observación, bajo aumento (10x) para exploración básica de la muestra, alto aumento (40x) para determinar la presencia de patógenos de gran tamaño como hongos filamentosos y parásitos e inmersión en aceite (100x) para reconocer levaduras, bacterias y células de gran tamaño (Murray et al., 2013).

2.4.2.1 Tinción eosina hematoxilina

Esta tinción es utilizada para el estudio de tejidos y células. En esta tinción se utilizan dos colorantes, la eosina y la hematoxilina, el primero tiñe de color morado-azulado a las estructuras básicas de las células de un color rosa y el segundo tiñe a los componentes ácidos de las células. El núcleo es un componente básico, mientras que el citoplasma es ácido (Montalvo, 2010; Ross y Pawlina, 2007; Verdín et al., 2013).

El procedimiento consta de las siguientes fases:

- Desparafinar con xilol
 - Hidratar con alcohol
 - Colorear con hematoxilina
 - Lavado con agua destilada
 - Coloración con eosina
 - Deshidratar con alcohol
 - Aclarar con xilol
- (Montalvo, 2010; Verdín et al., 2013).

2.4.2.2 Componentes celulares sanguíneos

Las células sanguíneas de los anfibios pueden ser clasificadas en tres grupos: eritrocitos, leucocitos y trombocitos. Cada una de dichas células varían de acuerdo a la especie de anuro, sin embargo, existen parámetros base que permiten la correcta identificación de las células y su relación con algunas patologías (Cabagna, Lajmanovich, Stringhini, Sanchez-Hernandez, y Peltzer, 2005; Gül, Tosunoğlu, Erdoğan, y Özdamar, 2011).

2.4.2.2.1 Eritrocitos

Los anfibios tienen eritrocitos nucleados de forma ovalada biconvexa plana. Es común observar formas inmaduras de eritrocitos debido a que maduran dentro de la circulación sanguínea (Claver y Quaglia, 2009; Cowell y Valenciano, 2014).

A la microscopia de campo claro y con tinciones de rutina, como eosina-hematoxilina, se observa el citoplasma homogéneo. El tamaño de los eritrocitos varía de acuerdo a la especie, estadio y edad del individuo (Cabagna et al., 2005). Existe una controversia en cuanto a la influencia del sexo del individuo sobre el tamaño de los eritrocitos (Gül et al., 2011).

2.4.2.2 Leucocitos

Los leucocitos son un grupo de células sanguíneas que abarca una serie de células. Para una mejor comprensión, los leucocitos se dividen a su vez en dos grupos: agranulocitos y granulocitos. Esta división depende de las características del citoplasma (Cabagna et al., 2005; Cowell y Valenciano, 2014).

Los agranulocitos no poseen granulaciones específicas en su citoplasma, a diferencia de los granulocitos. Dentro del grupo de granulocitos se encuentran los linfocitos, monocitos y azurófilos; mientras que el grupo de agranulocitos está formado por neutrófilos, heterófilos, eosinófilos y basófilos (Cabagna et al., 2005; Claver y Quaglia, 2009).

2.4.2.3 Trombocitos

Los trombocitos de los anfibios son similares a los linfocitos, con la diferencia que presentan forma de huso y su citoplasma es incoloro (Cabagna et al., 2005).

2.4.3 Cultivo bacteriano *in vitro* con medio enriquecido

El cultivo *in vitro* de bacterias es una prueba microbiológica utilizada para estimular el crecimiento bacteriano de una muestra biológica. Existen varios medios de cultivo con características específicas que promueven la reproducción de ciertos grupos bacterianos. El agar sangre de cordero es uno de los agares enriquecidos que brindan las condiciones óptimas para el crecimiento de una amplia gama de bacterias, es por ello que se lo utiliza como medio base para el estudio bacteriano (Murray et al., 2013).

Para la siembra adecuada de la muestra se utiliza la técnica del rayado de placas. Este proceso consiste en la distribución homogénea de la muestra, mediante la utilización de un asa bacteriológica. Se divide el agar en tres zonas. En la primera zona, se coloca el inóculo de la muestra con el asa y se distribuye el mismo en forma de rayado por toda la zona de manera homogénea. A continuación, se esteriliza el asa. En la segunda zona, se distribuye una porción de la muestra proveniente de la primera zona ingresando tres veces a dicha zona. En la tercera zona se repite el procedimiento desde la segunda zona (Rojas, Chaves, y García, 2006).

2.4.4 Tinción diferencial Gram

La tinción de Gram es la técnica de laboratorio predilecta para determinar la naturaleza de las bacterias y poder clasificarlas fenotípicamente. En esta prueba se utiliza el reactivo Gram que colorea a las bacterias positivas en tonos morados y a las negativas en tonos rosas, esto se da debido a que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular compuesta por una capa gruesa de peptidoglicano a diferencia de las bacterias Gram negativas (Murray et al., 2013).

2.4.5 Prueba de catalasa

La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan esta enzima hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso liberado en forma de burbujas, permitiendo la clasificación de bacterias Gram positivas en catalasa positiva o negativa (Bou, Fernández-Olmos, García, Sáez-Nieto, y Valdezate, 2011).

2.4.6 Prueba de oxidasa

La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana, permitiendo clasificar las bacterias Gram negativas en oxidasa positiva o negativa (Bou et al., 2011).

2.4.7 Microgen STREPT ID

Esta prueba de laboratorio sirve para identificar enterobacterias y una extensa gama de bacilos Gram negativos oxidasa positivos. El principio de acción del Microgen ID se basa en sustratos bioquímicos estandarizados, los cuales, al ser metabolizados por la bacteria en cuestión, cambian de color durante la incubación o al adicionar reactivos específicos (Microgen-Bioproducts-Ltd., 2004).

Esta prueba se conforma por dos tiras, A y B, con 12 pocillos que contienen diferentes sustratos. La tira A, comprende los siguientes sustratos: Lisina, Ornitina, H₂S, Glucosa, Manitol, Xilosa, ONPG, Indol, Ureasa, VP, Citrato y TDA. La tira B comprende los siguientes sustratos: Gelatina, Malonato, Inositol, Sorbitol, Ramnosa, Sucrosa, Lactosa, Arabinosa, Adonitol, Rafinosa y Salicina (Microgen-Bioproducts-Ltd., 2004).

Para realizar la identificación taxonómica de la bacteria aislada, las tiras que contienen los sustratos se encuentran divididas en tripletes. Cada sustrato que conforma el triplete tiene un valor numérico, según la reacción que presenten con el sustrato (positivo o negativo). De tal forma que la suma de las reacciones positivas de cada triplete forma un dígito del Código Octal, el cual se ingresa en el Software de Identificación de Microgen (Microgen Bioproducts Ltd., Camberley, Reino Unido), El resultado final es una lista de los cinco organismos con mayor probabilidad (Microgen-Bioproducts-Ltd., 2004).

2.4.8 Bilis esculina

La bilis esculina es un medio de identificación específico y selectivo, ya que no todas las bacterias pueden crecer con la presencia de bilis y logran hidrolizar la esculina; solo *Enterococcus* y los *Streptococcus* del grupo D poseen esta característica (Markey, Leonard, Archambault, Cullinane, y Maguire, 2013; Quinn et al., 2011).

Para realizar esta prueba, es necesario sembrar en el agar bilis esculina una colonia bacteriana de la muestra a estudiar, dicha siembra se realiza mediante estriado superficial de una capa fina de la muestra. Se incuba durante 24 horas a 37° C. El resultado a observar es el cambio de coloración del medio, si este no varía luego de la incubación la muestra es negativa y si se observa un cambio de coloración a café oscuro o negro es una muestra positiva (Markey et al., 2013).

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación

Los individuos estudiados pertenecen a la colección de anuros endémicos de la “Balsa de Sapos” de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por lo que el registro de las medidas morfométricas y la toma de muestra de líquido de edema de estos animales fueron realizadas en las instalaciones del mismo proyecto.

Mientras que el procesamiento de las muestras se realizó en las instalaciones de los laboratorios para manejo de muestras biológicas en la Sede Granados de la Universidad de las Américas.

La Balsa de Sapos de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y los laboratorios de la Universidad de las Américas, se encuentran ubicados en la ciudad de Quito, Ecuador.

3.2 Población y muestra

Para el estudio se escogió al azar 20 individuos con síndrome de edema pertenecientes al género *Gastrotheca*, diez hembras y diez machos. De la totalidad de individuos, ocho pertenecen a la especie *G. pseustes*, dos *G. riobambae* y diez *G. litonedis*. La unidad de estudio es el líquido de edema de dichos individuos.

Es necesario mencionar que el número de animales elegidos dependió de la cantidad de individuos que presentaban edema en el tiempo de realización del estudio, desde marzo hasta principios de mayo del presente año. La posibilidad de ceder los animales, por parte de la Balsa de Sapos, y la pérdida de individuos por muerte, fueron otros de los factores que afectaron al tamaño de la muestra.

3.3 Materiales

Debido a que el presente estudio se basa en la toma de muestras de líquido de edema y su posterior análisis de laboratorio, los materiales se dividen de acuerdo con la etapa en la que serán utilizados (Tabla 4). Los insumos de uso general (marcadores, cinta adhesiva, balanza, entre otros), insumos para mantener la bioseguridad y esterilidad de las muestras (mandiles, guantes, cooler, entre otros) no se detallan en la Tabla 4.

Los materiales necesarios para la toma de muestra de líquido proveniente de edema fueron considerados en base a estudios previos sobre la extracción de líquido de cavidad celómica en anfibios (Wright & Whitaker, 2001). Mientras que los materiales necesarios para el análisis de dichas muestras fueron considerados en base a estudios previos sobre la caracterización microbiológica y citológica de líquido en otras especies (Bou et al., 2011).

Tabla 4

Materiales para procedimientos de laboratorio y su cantidad según la etapa de identificación

	Materiales	Cantidad
Pre-análisis		
Toma de muestra	Clorhexidina 2%	1ml/40ml agua
	Gasas	3 gasas/animal
	Jeringas de 1ml	2/animal
	Agujas de calibre 25	2/animal
	Lidocaína	0,1ml/animal
Medio de transporte	Tioglicolato	1 por muestra
Análisis microbiológico		
Medio de cultivo	Sangre de cordero y MacConkey	1 por muestra

Tabla 4

Materiales para procedimientos de laboratorio y su cantidad según la etapa de identificación. (Continuación)

Tinción Gram	Violeta de Genciana	1 frasco
	Lugol	1 frasco
	Alcohol cetona	1 frasco
	Safranina o Fucsina	1 frasco
	Aceite de inmersión	1 frasco
	Porta objetos	1 por muestra
	Cubre objetos	1 por muestra
	Agua destilada	1 frasco
Catalasa	H ₂ O ₂ al 3%	1 frasco
	Hisopo	1 por muestra
	Porta objetos	1 por muestra
Oxidasa	Tira de Citocromo	1 por muestra
	Agua destilada	1 frasco
	Hisopo	1 por muestra
Bilis esculina	Agar bilis esculina	1 por muestra
Microgen ID	Kit completo	1 por muestra
Análisis citológico		
Tinción eosina-hematoxilina	Eosina	1 pocillo
	Hematoxilina	1 pocillo
	Neo Clear 1	1 pocillo
	Neo Clear 2	1 pocillo
	Etanol al 100%	2 pocillos
	Etanol al 95%	2 pocillos
	Etanol al 70%	2 pocillos

3.4 Metodología

La metodología de estudio se dividió en cinco etapas en el siguiente orden: pre análisis, análisis microbiológico, análisis citológico, análisis fisicoquímico y análisis estadístico. Cada una de las etapas se compone por diferentes actividades, como por ejemplo la recopilación de datos y posterior análisis de los mismos.

3.4.1 Pre análisis

Se procedió a la toma de medidas morfométricas de los individuos que participaron en el estudio. Se estableció el peso mediante el uso de balanza analítica y se tomó las medidas de circunferencia abdominal y largo rostro-cloacal con la ayuda de una cinta métrica.

Luego se realizó la toma de muestra de líquido de la cavidad celómica de acuerdo con el protocolo descrito por Wright y Whitaker (2001) en el libro *Amphibian medicine and captive husbandry*. Para lo cual se colocó al individuo decúbito-dorsal, se procedió a palpar y limpiar, con clorhexidina diluida, la región para-medial o para-lumbar. En esa región se ingresó la aguja de insulina y se extrajo 1 ml del líquido, se retiró la aguja con cuidado y se generó una pequeña presión en la zona con una gasa estéril.

La muestra extraída fue dividida en tres partes, para la caracterización microbiológica, citológica y fisicoquímica. El tercio del líquido escogido para la caracterización microbiológica fue inoculado en tubos con Tioglicolato, para ser transportados al laboratorio.

3.4.2 Análisis microbiológico

Esta etapa estuvo conformada por el aislamiento bacteriano en agar bipetri Sangre-MacConkey y la realización de las siguientes pruebas de laboratorio: Tinción Gram, Catalasa, Oxidasa, Bilis esculina y Microgen ID. Dichas pruebas fueron realizadas de acuerdo con el orden observado en la Figura 2. Al finalizar el análisis microbiológico se ingresó los datos obtenidos en el Software de

Identificación de Microgen (Microgen Bioproducts Ltd., Camberley, Reino Unido) y se interpretó los resultados.

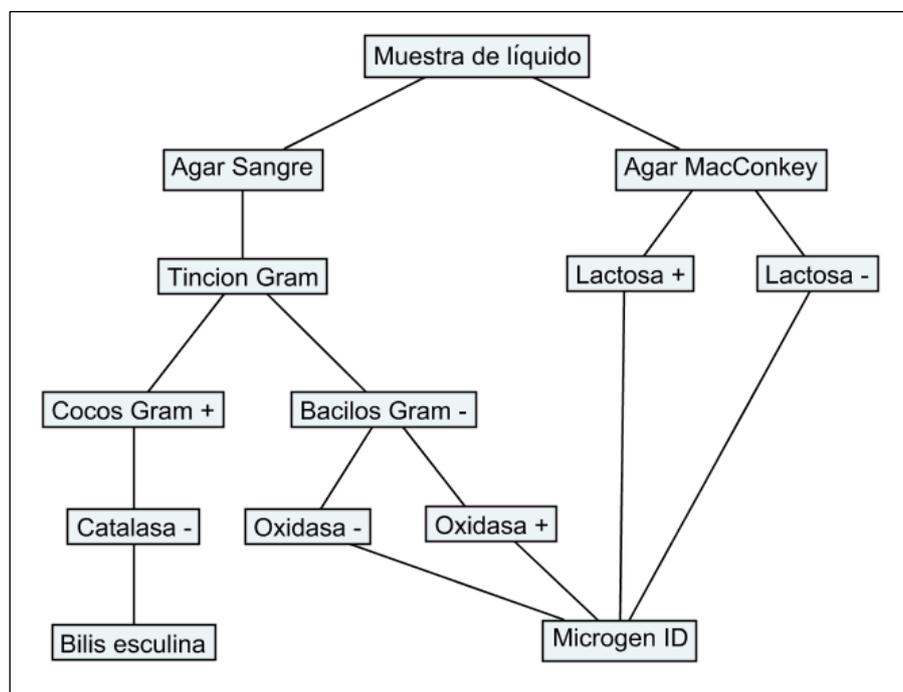


Figura 2. Mapa conceptual de las pruebas de identificación microbiológica utilizadas en el estudio.

3.4.3 Análisis citológico

Se realizó un frotis del líquido de edema, el cual fue teñido utilizando la técnica de tinción eosina-hematoxilina de acuerdo con el protocolo descrito por Verdi et al. (2013). Posterior a ello se realizó la lectura de dos placas por animal, mediante conteo celular y observación microscópica de las características del líquido.

3.4.4 Análisis fisicoquímico

Se conformó por la observación simple en la cual se detalló el color y aspecto del líquido. Para conocer el pH se utilizó tiras reactivas y la densidad del líquido fue medida con el refractómetro.

3.4.5 Análisis estadístico

Mediante la utilización del programa IBM SPSS Statistics 23 (IBM, USA) se obtuvo la media, mediana y desviación estándar de los resultados obtenidos en la caracterización microbiológica, citológica y fisicoquímica. Por último, con ayuda del mismo programa se realizó el análisis estadístico inferencial.

3.5 Diseño experimental

3.5.1 Variables

Las variables del estudio se detallan a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5

Matriz de variables.

Variables	Tipo Variable	Definición	Indicador	Unidad de medida
Sexo	Cualitativa/ discontinua	Valoración visual en base a literatura	Características anatómicas	Datos
Densidad	Cuantitativa/ continua	Medición de la densidad del líquido mediante refractómetro	Valoración por refractometría	g/dl
Peso	Cuantitativa/ continua	Peso del individuo	Medición en gramos	Gramos
Tamaño del animal	Cuantitativa/ continua	Tamaño del individuo	Largo rostro-caudal (LRC) Circunferencia abdominal (CA)	Milímetros
Grado del edema	Cuantitativa/ continua	Tamaño del individuo	Valoración según tabla	Grado
Bacterias	Cuantitativa/ continua	Caracterización de las bacterias presentes	Crecimiento bacteriano Taxonomía	Datos Número
Tipo de líquido	Cualitativa/ discontinua	Clasificación del líquido según sus componentes	Bacterias Color Turbidez Celularidad	Datos Escala Escala Datos

3.5.2 Hipótesis

3.5.2.1 Hipótesis del estudio

El líquido evaluado de edema de individuos *Gastrotheca* spp. en cautiverio, tiene componentes microbiológicos, bioquímicos y citológicos que corresponden al síndrome de edema causado por bacterias.

3.5.2.2 Hipótesis estadística

Hipótesis alterna: El líquido evaluado de edema de individuos *Gastrotheca* spp. en cautiverio, tiene componentes microbiológicos, bioquímicos y citológicos que varían de acuerdo con el sexo del individuo.

Hipótesis nula: El líquido evaluado de edema de individuos *Gastrotheca* spp. en cautiverio, tiene componentes microbiológicos, bioquímicos y citológicos que no varían de acuerdo con el sexo del individuo.

3.5.3 Diseño experimental

El estudio desarrollado es observacional analítico, con datos relacionados no pareados. Para lo que se utilizará una base de datos con los resultados obtenidos de cada una de las pruebas realizadas a los individuos de las especies *Gastrotheca* spp. Seguido del análisis estadístico de las variables independientes y variables dependientes; para así conocer las principales características relacionadas con el apareamiento de edema en los individuos de la Balsa de Sapos. El desarrollo del estudio es esquematizado en la Figura 3.

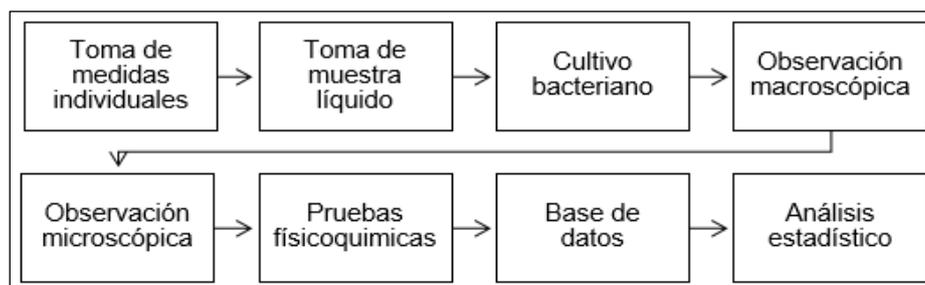


Figura 3. Esquema del diseño experimental.

3.5.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante la aplicación de pruebas simples estadísticas a las variables detalladas anteriormente, dependiendo de su naturaleza. Es decir, se analizaron las variables paramétricas cuantitativas mediante 'ANOVA y las variables no paramétricas mediante la prueba de Mann-Whitney. Se utilizó dichas pruebas debido a que el tamaño muestral es pequeño.

Para la clasificación de las variables y la posterior utilización de las pruebas mencionadas, se manejó el programa estadístico informático IBM SPSS Statistics. Dichas pruebas analizaron los resultados obtenidos por sexo, para su posterior comparación. Para ejemplificar el análisis estadístico utilizado, se toma en cuenta la variable dependiente cuantitativa: densidad del líquido.

Se clasificó los datos obtenidos de los individuos machos de la especie *Gastrotheca* spp., dichos datos fueron ingresados al programa estadístico mencionado para obtener así su varianza. Los datos obtenidos pueden ser paramétricos o no paramétricos, dependiendo de ello se realizó las pruebas estadísticas descritas en párrafos anteriores. Este mismo procedimiento se realizó con la información obtenida de los individuos hembras de la especie *Gastrotheca* spp.

De esta forma se compararon las características microbiológicas, citologías y fisicoquímicas del líquido de individuos según su sexo.

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Diagnóstico situacional

El proyecto de conservación “Balsa de Sapos” de la Pontífice Universidad Católica del Ecuador engloba una extensa colección de anfibios, conformada por varias especies endémicas en peligro de extinción, como las ranas del género *Gastrotheca* (PUCE, 2006).

Dentro de este proyecto existen varias especies que presentan edema, sin embargo, los individuos del género *Gastrotheca* son los más afectados. A la fecha de muestreo 41 individuos de dicho género presentaban edema, de los cuales 18 pertenecen a la especie *G. pseustes*, 19 a la especie *G. litonedis* y 4 a la especie *G. riobambae*.

A pesar de esto, hasta la fecha, no se han realizado estudios que determinen las características microbiológicas y citológicas del líquido que los compone. Cabe mencionar que existe un estudio previo sobre la caracterización histopatológica de órganos afectados por síndrome de edema en individuos *Gastrotheca* de la misma institución (Quishpe, 2016).

4.2 Resultados

Para mejor comprensión, se clasificó los resultados en base a las pruebas realizadas. A continuación, se detallan los resultados obtenidos en las categorías de caracterización microbiológica, caracterización citológica y fisicoquímica, estadística inferencial y hallazgos anatómicos macroscópicos de los animales estudiados.

4.2.1 Caracterización microbiológica

De la totalidad de las muestras sembradas en agar Sangre de Cordero, el 40% no presentó crecimiento bacteriano, el 30% fue cultivo mixto y el 30% restante cultivo puro; teniendo como resultado 8 colonias bacterianas puras. De las cuales, el 78% fueron bacterias con morfología bacilar Gram negativa y el 22% fueron bacterias con morfología de cocos Gram positivos, dicha morfología bacteriana se observan en la Figura 4.

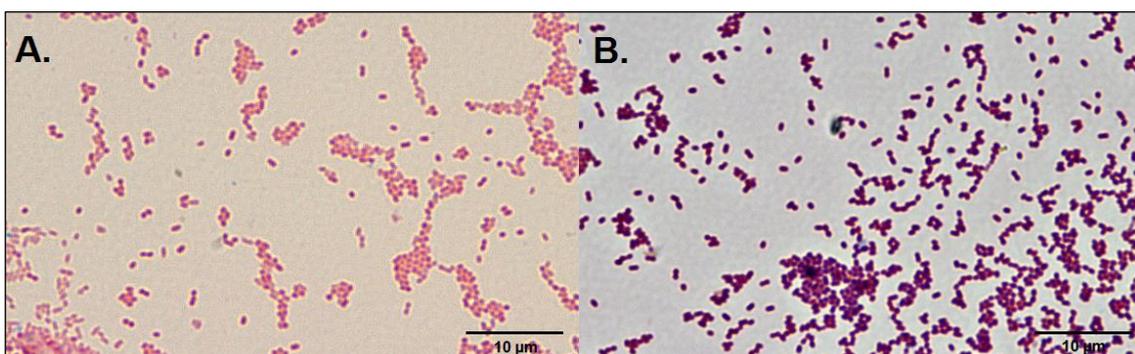


Figura 4. Morfología bacteriana observada mediante tinción Gram. A. Bacilos Gram negativos. B. Cocos Gram positivos (100x).

Como se observa en la Figura 5, el crecimiento bacteriano de las muestras provenientes de hembras fue mayoritariamente cultivos puros, mientras que las muestras provenientes de machos tuvieron crecimiento mixto en su mayoría.

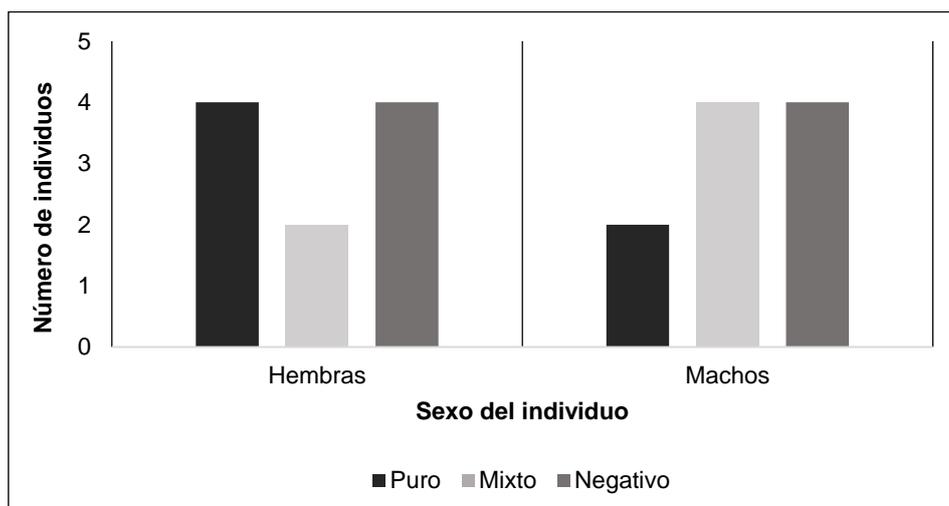


Figura 5. Crecimiento bacteriano con relación al sexo de los individuos.

La identificación bacteriana final determinó que el 50% de las bacterias pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, el 17% a la familia *Enterococcaceae*, el 11% a la familia *Burkholderiaceae*, el 6% a la familia *Pseudomonaceae*, el 6% a la familia *Pasteurellaceae*, el 6% a la familia *Streptococcaceae* y el 6% restante a la familia *Aeromonadaceae*.

Los nombres científicos de la totalidad de bacterias encontradas en las muestras de líquido de edema con crecimiento bacteriano positivo se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6

Bacterias identificadas, número de muestras en las que están presentes y el porcentaje con relación a las muestras con crecimiento bacteriano positivo.

Bacteria identificada	Número de muestras	% Total
<i>Klebsiella ozaenae</i>	2	11%
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	2	11%
<i>Enterococcus</i>	3	17%
<i>Streptococcus</i>	1	5,6%
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	5,6%
<i>Pasteurella haemolytica</i>	1	5,6%
<i>Hafnia alvei</i>	1	5,6%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	5,6%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	5,6%
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1	5,6%
<i>Enterobacter gergoviae</i>	1	5,6%
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	5,6%
<i>Salmonella arizonae</i>	1	5,6%
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1	5,6%
Total	18	100%

4.2.2 Caracterización citológica

Del total de las muestras analizadas, el 30% de las muestras no presentaron componentes celulares, mientras que el 70% restante sí. Los valores celulares obtenidos de dichas muestras se encuentran representados en la Tabla 7, donde se detalla que las células observadas con mayor frecuencia fueron linfocitos, seguidos por eritrocitos.

Tabla 7

Valores promedio de la serie eritrocitaria y leucocitaria de líquido de edema de 20 individuos del género Gastrotheca

Serie Eritrocítica	
Eritrocitos (%)	20,48 ± 25,5 (0 – 73)
Serie Leucocítica	
Neutrófilos (%)	3,18 ± 4,01 (0 – 13)
Heterófilos (%)	0,3 ± 0,52 (0 – 2)
Eosinófilos (%)	1 ± 1,74 (0 – 7)
Basófilos (%)	1,43 ± 3,9 (0 – 18)
Linfocitos (%)	42,05 ± 33,67 (0 – 91)
Monocitos (%)	0,15 ± 0,33 (0 – 1)
Trombocitos (%)	1,43 ± 1,29 (0 – 4)

Nota. Media ± desviación estándar (mínimo – máximo).

En cuanto a la relación entre el conteo celular y el sexo del individuo, se encontró que el 20,1% de células en hembras fueron eritrocitos y el 17,4% en machos. A su vez, se encontró que el 32,7% de células en hembras fueron linfocitos y el 46,5% en machos. Por lo que, no se identificó una diferencia marcada, como se observa en la Figura 6.

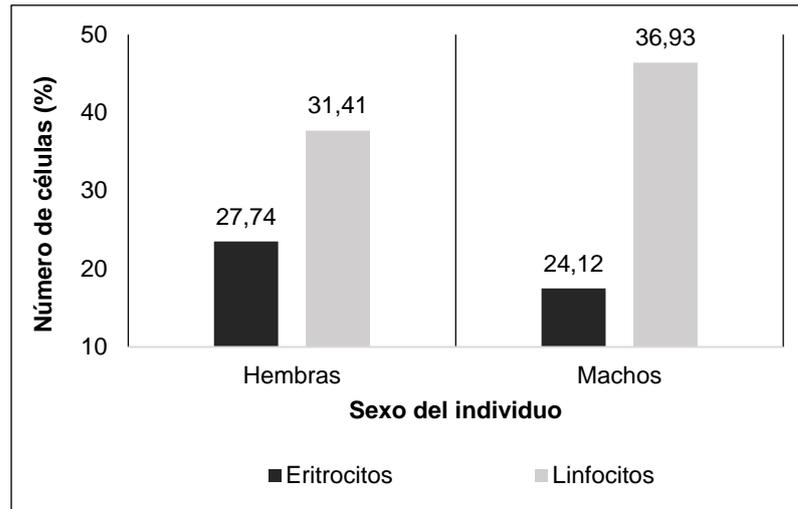


Figura 6. Relación entre el porcentaje de eritrocitos y linfocitos con el sexo del individuo.

La morfología de las células observadas se presenta en la Figura 7, donde se puede apreciar las diferencias marcadas que facilitan su identificación. De igual forma, se describió fagosomas o vacuolas de fagocitación en los leucocitos por infección bacteriana, un ejemplo de ello se observa en la Figura 8.

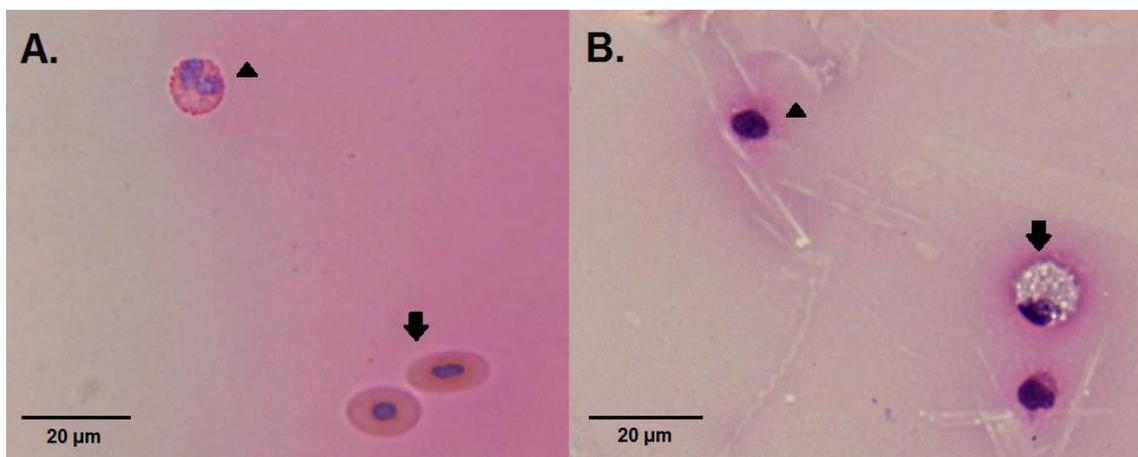


Figura 7. Morfología celular observada. Mediante tinción hematoxilina-eosina. A. Eritrocitos (flecha) y Heterófilos (triángulo). B. Neutrófilo reactivo (flecha) y Linfocito (triángulo). (40x).

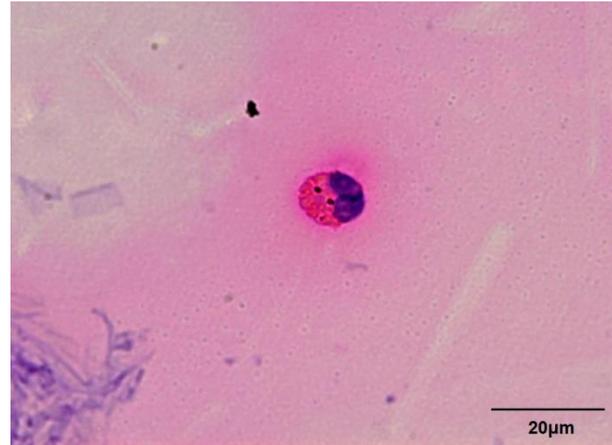


Figura 8. Heterófilo con vacuolas de fagocitación.

De igual forma, se identificó la presencia de elementos acidofílicos y basofílicos en las placas para conteo celular. A la observación microscópica, dichos elementos se observaron como en la Figura 9.

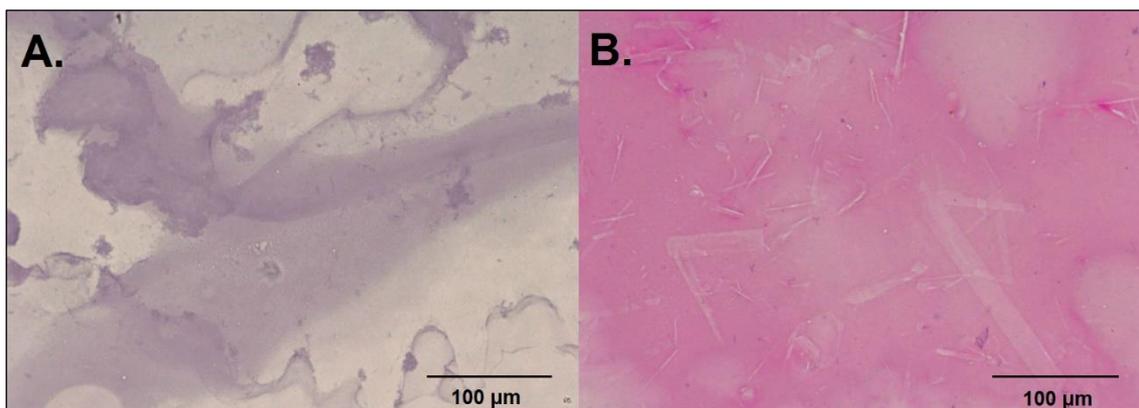


Figura 9. Componentes acidofílicos y basofílicos observados mediante tinción Hematoxilina-eosina. A. Elementos basofílicos. B. Elementos acidofílicos. (10x).

La totalidad de las muestras de líquido de edema presentaron componentes acidofílicos y basofílicos en diferentes proporciones. Como se observa en la Figura 10, un mayor número de muestras una leve presencia de elementos basofílicos y acidofílicos, a su vez, se observó una presencia abundante de elementos acidofílicos en algunas muestras.

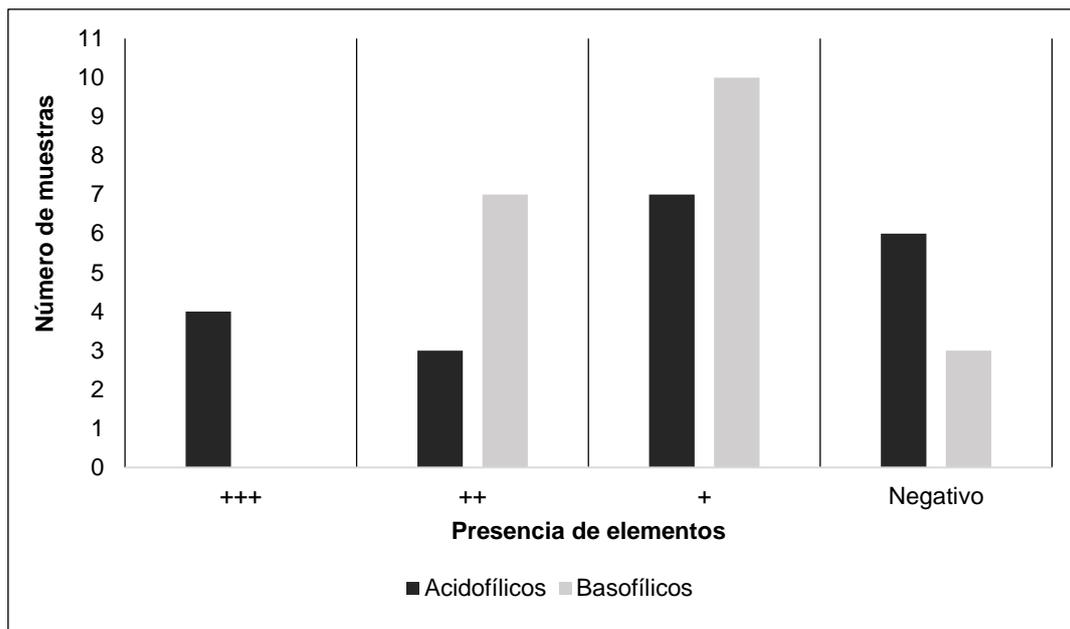


Figura 10. Presencia de elementos basofílicos y acidofílicos encontrados en el líquido de edema.

4.2.3 Caracterización fisicoquímica

Se clasificó la totalidad de las muestras de líquido de acuerdo con la observación de la coloración, en dos categorías, resultando que el 50% de las muestras fue incolora y el 50% restante colora. No hubo variaciones en cuanto a la distribución de estos datos de acuerdo con el sexo del individuo (Figura 11).

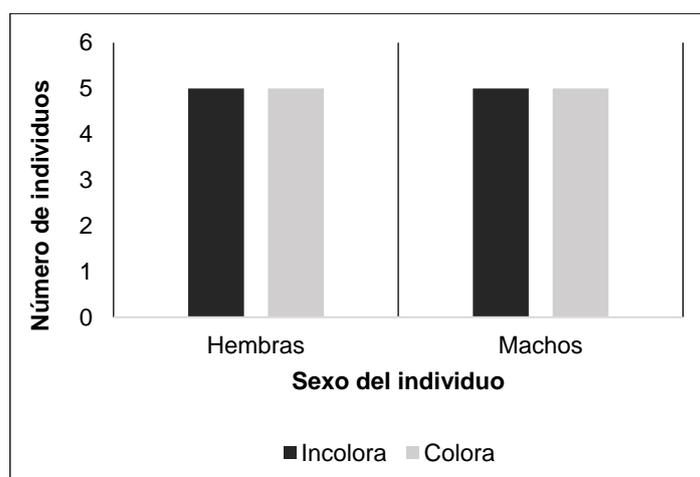


Figura 11. Coloración del líquido de edema.

De igual forma se clasificó el estado de turbidez del líquido en tres categorías, teniendo por resultado que el 70% de las muestras fue nítido, el 25% fue poco nítido y el 5% fue turbio. Las muestras provenientes de individuos machos fueron en su mayoría nítidas, a diferencia de las muestras provenientes de hembras que presentaron mayor porcentaje en la categoría de poca turbidez; la distribución de estos datos de acuerdo con el sexo del individuo se observa en la Figura 12.

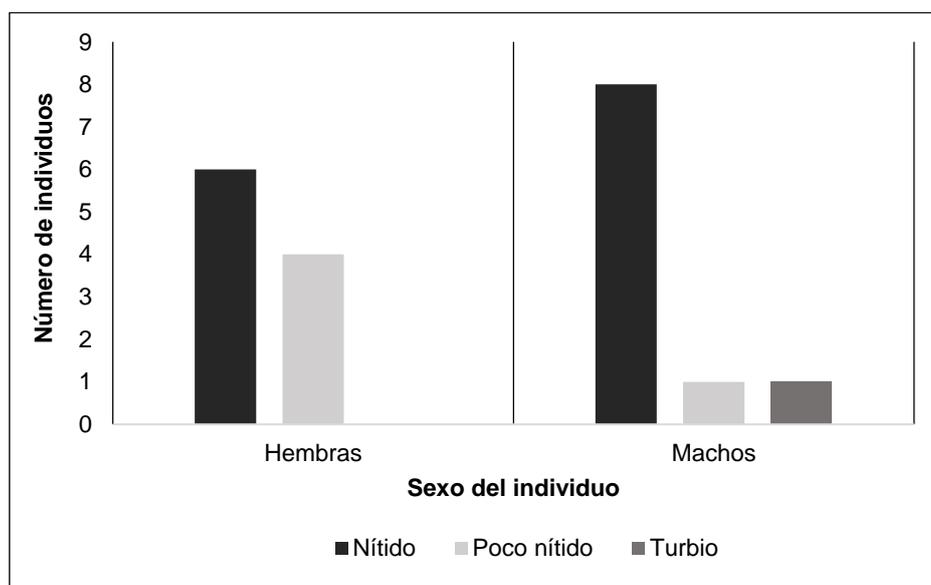


Figura 12. Aspecto de la muestra con relación al sexo de los individuos.

En cuanto a la medición del pH, todas las muestras fueron identificadas como ligeramente alcalinas con pH 8.

En cuanto a la densidad de líquido con relación al sexo de los individuos, observamos en la Figura 13 que en el caso de las hembras la mayoría de los datos se encuentran en la parte inferior, por lo que la distribución de los datos es asimétrica. Mientras que en el caso de los datos de densidad de líquido en machos los datos tienen una distribución más simétrica.

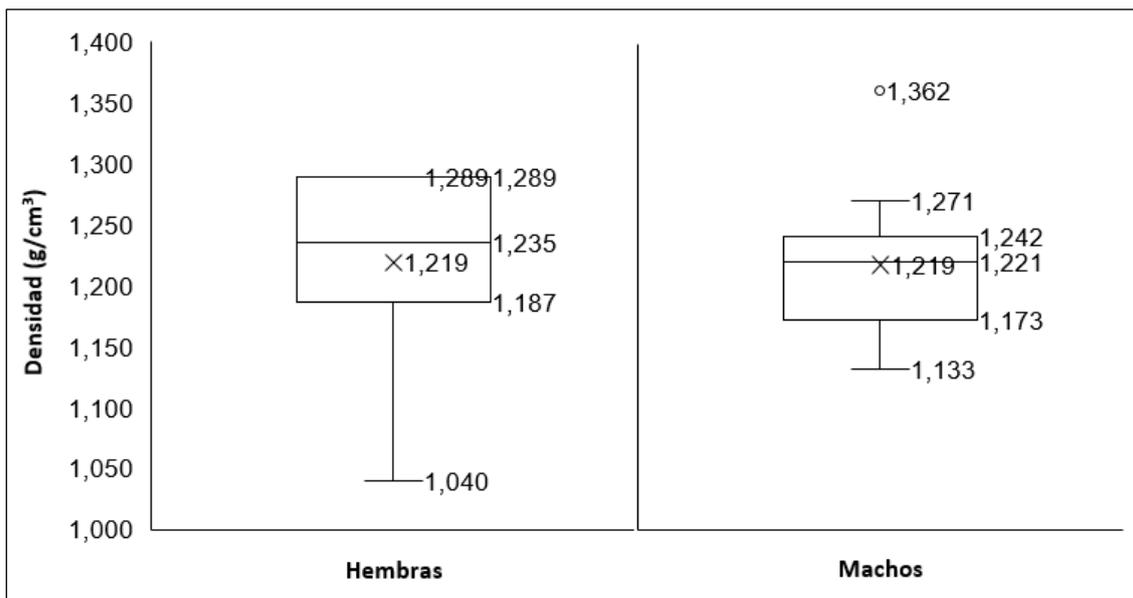


Figura 13. Distribución de los datos de densidad del líquido con relación al sexo de los individuos. Se observa la media, mediana, cuartiles, valor mínimo, valor máximo y valores atípicos.

De acuerdo con las características citológicas y fisicoquímicas detalladas anteriormente, se identificó el 35% de la totalidad como exudado no séptico, el 40% como exudado séptico y el 25% restante como trasudado. Los datos por individuo se detallan en el Anexo 2. En cuanto a la relación de dichos datos de acuerdo con el sexo del individuo, solo las hembras presentaron trasudados y los machos presentan mayor cantidad de muestras de exudado no séptico (Figura 14).

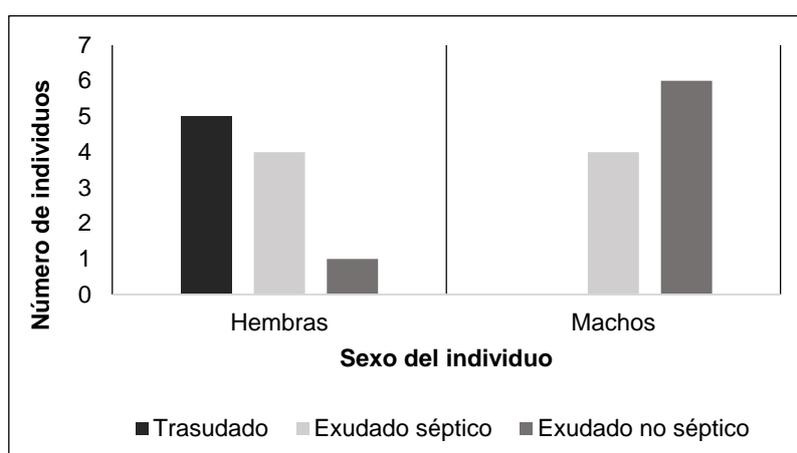


Figura 14. Clasificación del tipo de líquido con relación al sexo de los individuos

4.2.4 Estadística inferencial

En la Figura 15, regresión lineal simple, se observa que no existe una coorelacion fuerte entre la variable densidad hembras y la variable peso hembras ($R^2=0,105$). La relación lineal es negativa, lo que quiere decir que mientras la variable peso aumenta, la variable densidad disminuye. 0 indica la no representatividad del valor lineal.

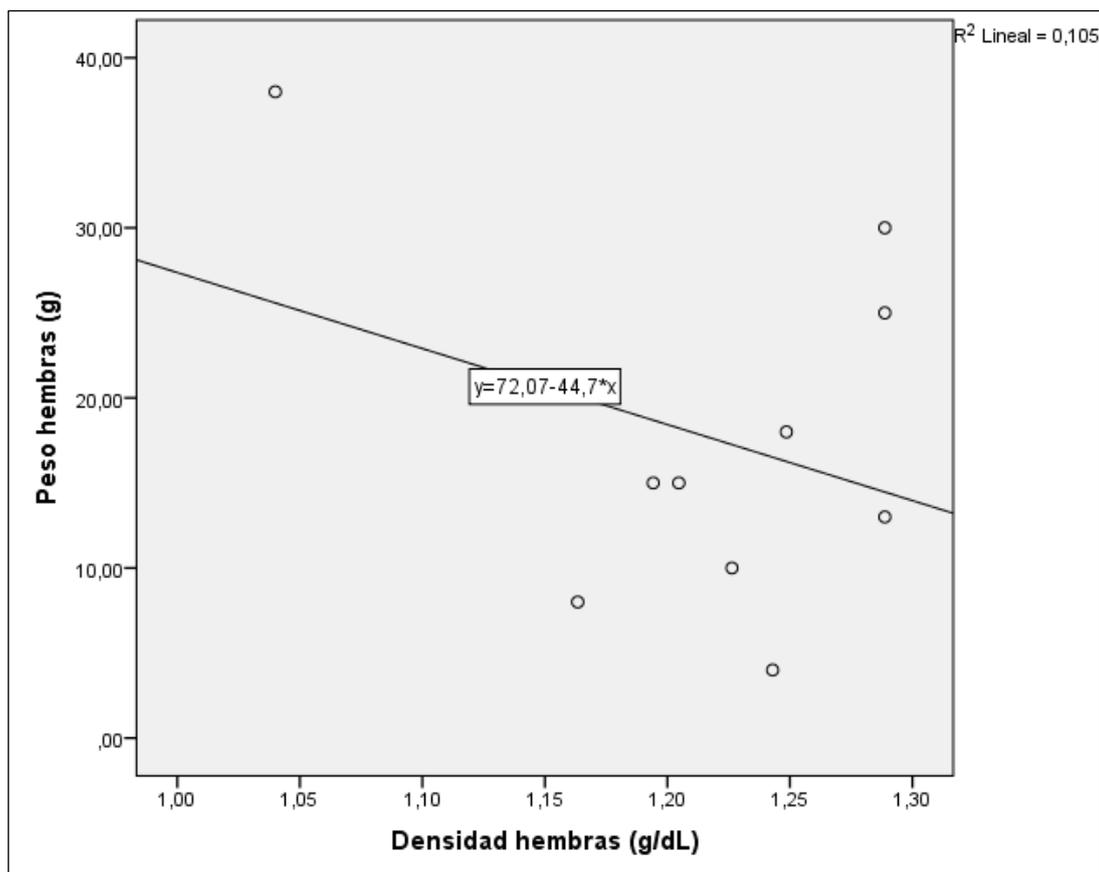


Figura 15. Diagrama de dispersión que relaciona la variable Densidad hembras (g/dl) con la variable Peso hembras (g).

De igual manera, la regresión lineal simple (Figura 16) detalla que la correlación entre la variable densidad machos y la variable peso machos no es fuerte ($R^2=0,239$). La relación lineal es positiva, lo que indica que mientras la variable peso aumenta, la variable densidad lo hace de igual manera.

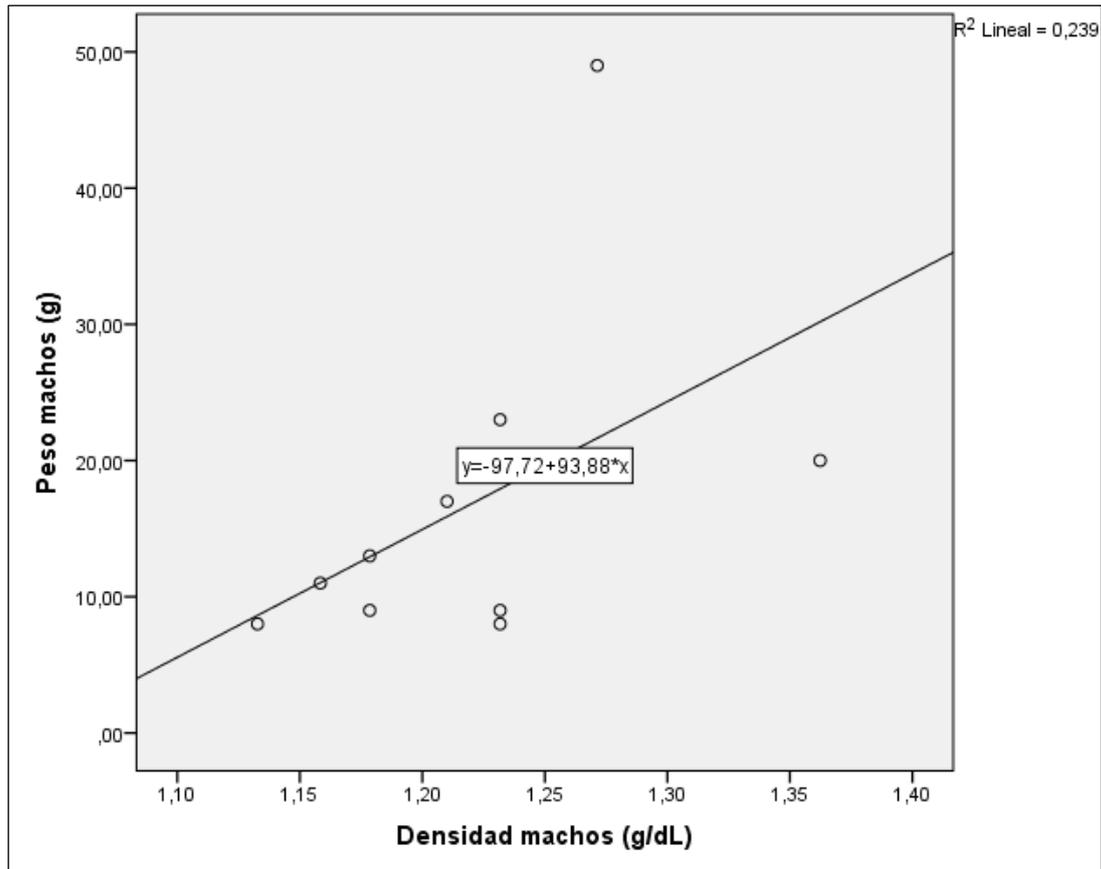


Figura 16. Diagrama de dispersión que relaciona la variable Densidad machos (g/dl) con la variable Peso machos (g).

En cuanto a la correlación entre las variables densidad hembra y circunferencia abdominal hembra, la regresión lineal simple (Figura 17) detalla que la correlación es débil entre las variables mencionadas ($R^2=0,065$). La relación lineal es positiva, lo que indica que mientras la variable densidad hembra aumenta, la variable circunferencia abdominal hembra lo hace de igual manera.

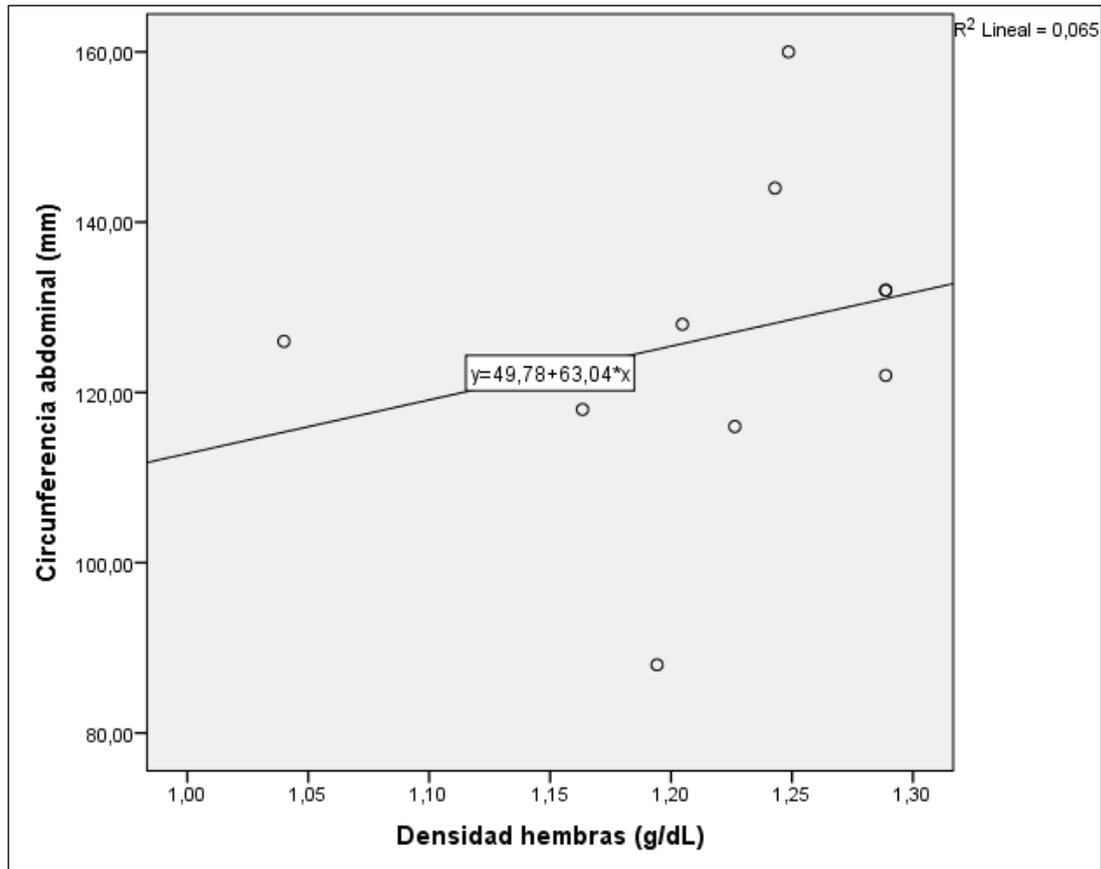


Figura 17. Diagrama de dispersión que relaciona la variable Densidad hembras (g/dl) con la variable Circunferencia abdominal hembras (mm).

De igual manera, la regresión lineal simple (Figura 18) detalla que no existe una correlación entre la variable densidad machos y la variable circunferencia abdominal machos ($R^2 = 1,435 \times 10^{-4}$). La relación lineal no existe, ya que el valor de R^2 es muy cercano a cero y esto indica que el valor lineal no es representativo.

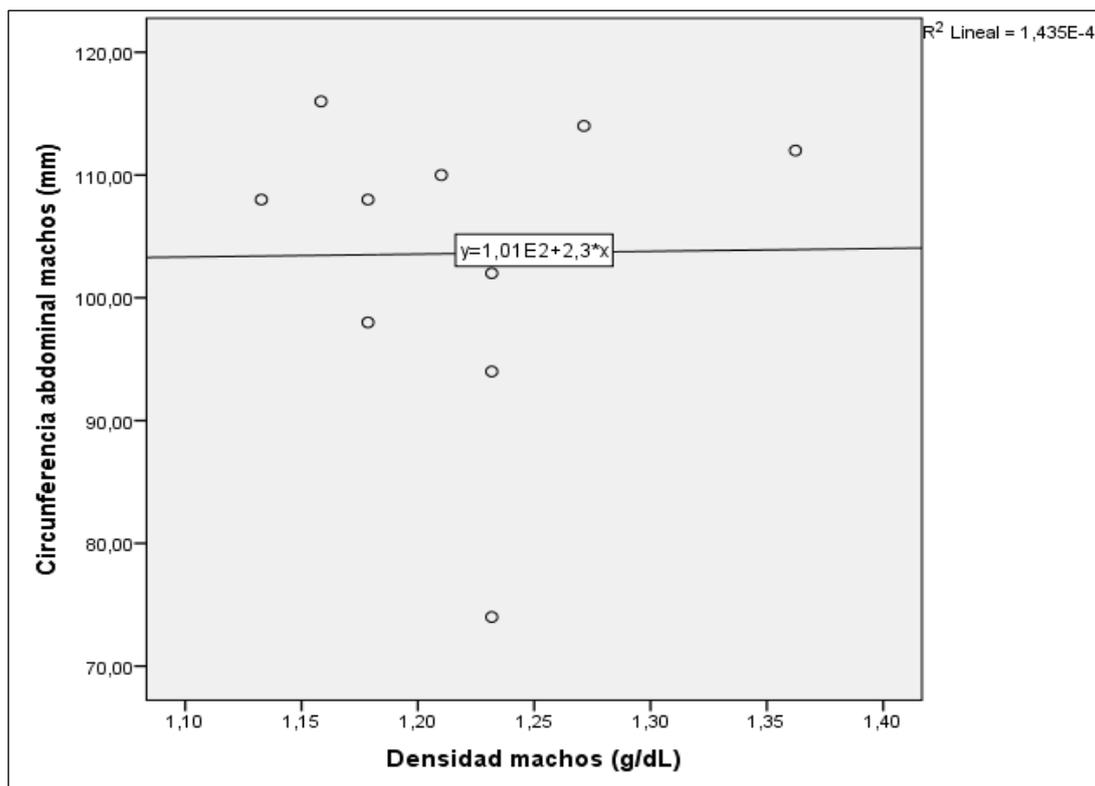


Figura 18. Diagrama de dispersión que relaciona la variable Densidad machos (g/dl) con la variable Circunferencia abdominal machos (mm).

Por último, al analizar los datos obtenidos en el conteo celular con relación al sexo de los individuos, mediante la prueba de Mann-Whitney, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las comparaciones realizadas, debido a los p-valor observados en la Tabla 8.

Tabla 8

Resultados estadísticos obtenidos de la relación entre el sexo del individuo y las diferentes células encontradas

Resultado	Eritrocitos		Neutrófilos		Heterófilos		Eosinófilos	
	H	M	H	M	H	M	H	M
Tamaño de la muestra	10	10	10	10	10	10	10	10
Rango intercuartil (Ri)	112 ^a	98 ^a	112 ^a	98 ^a	120 ^a	90 ^a	94 ^a	116 ^a
Mediana	16,2 ^a	6,25 ^a	2,5 ^a	1,25 ^a	0,25 ^a	0 ^a	0 ^a	0,25 ^a
Media	43		43		35		39	
Puntuación Z (U)	0,5292		0,5292		11,339		0,8315	
p-valor (unilateral)	0,2984		0,2984		0,1284		0,2028	
p-valor (bilateral)	0,5967		0,5967		0,2568		0,4057	

Nota. H= Hembras; M= Machos; ^a No existen diferencias significativas.

Tabla 8

Resultados estadísticos obtenidos de la relación entre el sexo del individuo y las diferentes células encontradas. (Continuación)

Resultado	Basófilos		Linfocitos		Monocitos		Trombocitos	
	H	M	H	M	H	M	H	M
Tamaño de la muestra	10	10	10	10	10	10	10	10
Rango intercuartil (Ri)	121,5 ^a	88,5 ^a	95 ^a	115 ^a	116 ^s	94 ^a	99 ^a	111 ^a
Mediana	0,5 ^a	0 ^a	38,5 ^a	50,25 ^a	0 ^a	0 ^a	1,25 ^a	1,5 ^a
Media	33,5		40		39		44	
Puntuación Z (U)	12,473		0,7559		0,8315		0,4536	
p-valor (unilateral)	0,1061		0,2248		0,2028		0,3251	
p-valor (bilateral)	0,2123		0,4497		0,4057		0,6501	

Nota. H= Hembra; M= Machos; ^a No existen diferencias significativas.

4.2.5 Hallazgos anatómicos macroscópicos

Dentro de las características anatómicas macroscópicas de los animales estudiados, se identificó el grado de edema y la presencia de otras patologías aparte del síndrome de edema. De igual manera se presentan a continuación los datos morfométricos de dichos animales.

4.2.5.1 Grado de edema y patologías presentes

A pesar de que todos los individuos estudiados presentan edema, el grado de desarrollo del mismo varía entre los individuos. El 15% de estos presentaron un grado leve de edema, mientras que el 40% presentó un grado de edema moderado y el 45% restante presentó un grado de edema severo (Anexo 3).

Los individuos estudiados presentaban otras patologías, las cuales no fueron diagnosticadas en esta investigación puesto a que no es el objetivo de la misma. Sin embargo, es necesario puntualizar que los dos signos clínicos encontrados con mayor frecuencia fueron monoplejía en el 44% y nubosidad corneal en el 33% de los individuos estudiados (Tabla 9). Las condiciones anatómicas de los animales que presentaron dichas enfermedades se observan en la Figura 19.

Tabla 9

Patologías observadas en los individuos con edema

Individuo	Especie	Diagnostico presuntivo
6	<i>G. riobambae</i>	Parálisis de miembro posterior derecho.
8	<i>G. litonedis</i>	Parálisis de miembro posterior derecho.
9	<i>G. pseustes</i>	Parálisis de miembro posterior izquierdo.
10	<i>G. pseustes</i>	Parálisis de miembro posterior derecho.
11	<i>G. pseustes</i>	Lipidosis corneal en ojo izquierdo.
13	<i>G. litonedis</i>	Fractura de miembro posterior izquierdo (MPI).
14	<i>G. litonedis</i>	Lipidosis corneal bilateral.
15	<i>G. litonedis</i>	Fractura de MPI y presencia de masa en la ventosa adhesiva del ultimo dedo del MAI.
20	<i>G. litonedis</i>	Lipidosis corneal bilateral.

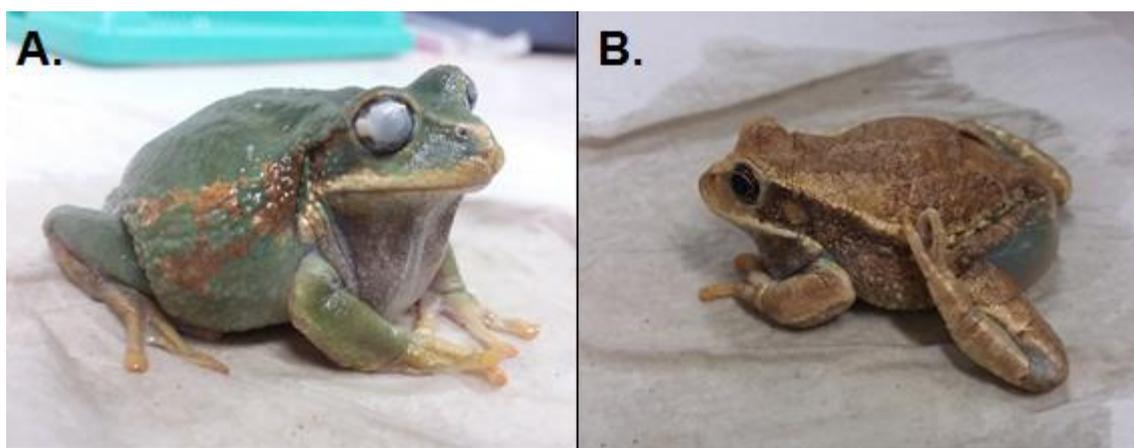


Figura 19. Observación macroscópica de las enfermedades presentes en los animales estudiados. A. Lipidosis corneal. B. Monoplejía.

4.2.5.2 Medidas morfométricas

Para identificar las características morfométricas de los animales estudiados, se tomó tres medidas: peso, circunferencia abdominal (CA) y longitud rostro-caudal (LRC). En la Tabla 10 se observa los datos de dichas medidas morfométricas, las hembras presentan mayor peso que los machos, sin embargo, se observan datos atípicos.

De igual manera, los datos obtenidos sobre la CA son menores en el caso de los machos y mayores en las hembras. No existe una variación marcada en cuanto a los datos de LRC de ambos sexos.

Tabla 10

Medidas morfométricas de los animales de estudio

Sexo	Peso (g)	CA (mm)	LRC (mm)
Hembras	17,6 ± 10,51 (4,00 – 38,30)	126,6 ± 18,79 (88,00 – 160,30)	55,5 ± 11,54 (48,00 – 83,00)
Machos	16,7 ± 12,52 (8,00 – 49,00)	103,6 ± 12,54 (74,00 – 116,00)	56,0 ± 10,50 (37,00 – 65,00)

Nota. Media ± desviación estándar (mínimo – máximo).

4.3 Discusión

El síndrome de edema en anfibios es una condición común e inespecífica, causada por múltiples alteraciones (Heinz-Taheny, 2009), las cuales comprometen el equilibrio osmótico del individuo. Dentro de los principales causantes de esta enfermedad están la enfermedad renal, enfermedad cardiovascular, septicemia bacteriana, condiciones de cautiverio deficientes y problemas metabólicos (Clayton y Gore, 2007), siendo las más comunes la enfermedad renal y los problemas metabólicos (Pessier, 2009).

Debido a los múltiples causantes de síndrome de edema, es necesario realizar diferentes pruebas de diagnóstico. Garner (2012) y Bertelsen y Crawshaw (2003) recomiendan realizar análisis de fluidos, citología, cultivo bacteriano necropsia, entre otros.

Caracterización microbiológica

No se conocen infecciones bacterianas que sea específicas de anfibios, la mayoría de septicemias bacterianas son causadas por bacterias Gram negativas, aunque existen algunos reportes de septicemias causadas por bacterias Gram positivas (Heinz-Taheny, 2009). Dicho enunciado coincide con lo encontrado en el presente estudio, donde el 78% de bacterias identificadas fueron Gram negativas y el 22% restante fueron bacterias Gram positivas.

Al evaluar una infección bacteriana se debe tener en cuenta que la presencia de bacterias en un cultivo no siempre indica enfermedad, ya que estas pueden ser bacterias de la microbiota normal del individuo (Klaphake, 2009). De hecho, estudios recientes demuestran que la microbiota normal protege al individuo contra enfermedades de origen viral, parasitario, fúngico y bacteriano (Sheafor, Davidson, Parr y Rollins-Smith, 2008).

Las bacterias potencialmente patógenas identificadas coinciden con las detalladas en la literatura. Entre las cuales están: *Streptococcus* (Montel et al., 2012), *Klebsiella* spp. (Montel et al., 2012; Schumacher, 2006), *Hafnia alvei* (Montel et al., 2012; Reavill, 2001), *Pseudomonas* spp. (Cecil, 2006; Montel et al., 2012), *Enterobacter* spp. (Pasteris, Buhler y Nader-Macías, 2006), *Aeromonas hydrophila* (Clayton y Gore, 2007; Pessier y Mendelson III, 2017), *Salmonella* spp. (Crawshaw, 1992; Wright y Whitaker, 2001), *Enterococcus* spp. (Clayton y Gore, 2007) y *Pasteurella* spp. (Mader, 2006). No se encontró información acerca de *Yersinia enterocolitica* y *Burkholderia pseudomallei*.

Dentro de la literatura citada sobre los datos obtenidos de *Pseudomonas* spp. es necesario enfatizar en el reporte realizado por Bresciano et al. (2015), en el cual se identifica a *Pseudomonas fluorescens* en un individuo *G. riobambae*. Lo cual coincide con la identificación realizada en el presente estudio.

A pesar de que dichas bacterias han sido descritas como propias de la microbiota de anfibios, es necesario mencionar que muchas de las infecciones primarias causadas por patógenos virales o fúngicos están acompañadas por infecciones secundarias bacterianas. A su vez, las infecciones bacterianas primarias suelen presentarse debido a la mala calidad del agua o a un manejo pobre. (Mader, 2006; Miller et al., 2008; Pessier, 2009; Wright y Whitaker, 2001).

En el presente estudio se encontró *Salmonella* spp., la cual ha sido detallada como propia de la microbiota de anfibios. Sharma et al. (1974) detallan que la prevalencia de esta bacteria en anfibios clínicamente normales es del 10% al 60%, por lo que se debe tener en cuenta los efectos zoonóticos de la misma.

Otros agentes infecciosos incluyen *Aeromonas hydrophila* (Heinz-Taheny, 2009), la cual tiene un alto potencial epizootico (Klaphake, 2009). En su mayoría, las infecciones causadas por *Aeromonas* o *Pseudomonas* son secundarias a manejo inadecuado en cautiverio (Berger, 2001). Por ello, se sugiere que estas bacterias no son causantes del síndrome de edema en los individuos estudiados, siendo una infección bacteriana de tipo secundaria.

En una investigación realizada en ranas con síndrome de pata roja se aislaron *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* spp. y *Streptococcus iniae*, los cuales fueron identificados como patógenos causales de dicho síndrome (Mauel, Miller, Frazie y Hines, 2002). A pesar de encontrar *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* spp. y *Streptococcus* spp. en el presente estudio, no se encontraron signos clínicos de dicho síndrome, por lo que se sugiere que el síndrome de edema en estos animales no es consecuencia del síndrome de pata roja.

La presencia de las bacterias descritas con anterioridad se da como consecuencia de una infección secundaria, la cual puede estar derivada del manejo en cautiverio, ya que los anfibios son exigentes en cuanto a los requisitos ambientales y nutricionales (Densmore y Green, 2007).

Caracterización citológica

Los valores de referencia de resultado de laboratorio deben ser específicos para cada especie y deben basarse en muestras recolectadas de individuos clínicamente normales (Stockham y Scott, 2008). Por lo que, los valores de referencia de anfibios son escasos y en la mayoría de las especies no existen, siendo este el caso de las especies que pertenecen al género *Gastrotheca*.

En cuanto a la morfología de las células sanguíneas, existen autores que describen una similitud de las células de anfibios con otros vertebrados (Wright y Whitaker, 2001). Sin embargo, algunos reportes señalan que las células son más similares a las presentes en peces (Campbell y Ellis, 2007).

A su vez, las características morfológicas como tamaño celular, tamaño del núcleo, entre otras; varían entre especies de anuros (Claver y Quaglia, 2009).

Debido a la dificultad para describir el tamaño normal de las células, en este estudio no se realizó una comparación de las características morfológicas de las células encontradas, sino, un conteo celular y descripción de anormalidades generales.

Es necesario mencionar que, en anfibios, el conocimiento de la respuesta de la serie leucocitaria frente a las enfermedades es limitado (Campbell y Ellis, 2007). De acuerdo con lo establecido por Campbell y Ellis (2007), la eosinofilia se relaciona con parasitismo y ha documentada en infestaciones de nematodos (Mitchell, 1982). Descartando así, el parasitismo como causa del síndrome de edema en los individuos estudiados.

Los cambios observados en infecciones por hongos dependen del sitio y del grado de infección (Pessier, Nichols, Longcore y Fuller, 1999). Por ejemplo, en infecciones por *Saprolegnia* se describe monocitosis y en infecciones por *Batrachochytrium dendrobatidis* no se describen cambios a nivel de células sanguíneas (Pessier et al., 1999). Por esta razón, en base a los resultados obtenidos en el presente estudio se descarta una infección producida por hongos como el causal del síndrome de edema.

En el caso de infecciones causadas por virus, la documentación de cambios en células sanguíneas de anfibios es escasa (Allender y Fry, 2008). La razón de esto es que los animales normalmente fallecen antes de ser detectadas las anomalías celulares, los pocos registros describen inclusiones a nivel del núcleo o citoplasma de los eritrocitos (Campbell y Ellis, 2007; Speare, Freeland, y Bolton, 1991).

En el presente estudio no se realizaron pruebas de identificación viral. Sin embargo, en base a los datos descritos con anterioridad, no se identifica una infección viral como la causa del síndrome de edema en los individuos estudiados.

Por otro lado, las infecciones bacterianas son comunes en anfibios en cautiverio y en infecciones crónicas causan heterofilia y monocitosis (Turner, 1988; Wright y Whitaker, 2001), siendo los heterófilos las células primarias inflamatorias agudas encargadas de fagocitar a las bacterias (Wright y Whitaker, 2001). De igual forma, existen estudios que detallan un aumento periférico de células fagocíticas, medida que disminuye la infección causada por *Staphylococcus* (Koliass, 1984).

Los linfocitos también cumplen un papel importante en el control de infecciones bacterianas. Un ejemplo de ello es descrito en el estudio de Li et al (2006), en el cual se concluye que los linfocitos B de individuos *Xenopus* son capaces de fagocitar como respuesta a infecciones bacterianas. En el presente estudio, existe una relación entre los resultados obtenidos en la caracterización microbiológica y la linfocitosis y neutrofilia observada, debido a la presencia bacteriana.

Cabe mencionar que la monocitosis se relaciona con inflamación y la linfocitosis está relacionada con estrés y estimulación inmunológica (Allender y Fry, 2008; Terio, 2004). Un estudio realizado en individuos propios de la herpetofauna de Turquía determinó que el 80% de los leucocitos presentes en sangre periférica fueron linfocitos y monocitos (Çiçek y Arıkan, 2010). Lo que coincide con lo mencionado por Cabagna et al. (2014), que los linfocitos suelen ser encontrados con mayor frecuencia. Estas características que se cumplen en los animales estudiados.

El conteo de basófilos fue bajo, lo cual coincide con lo establecido por Mitchell, que dictamina que la cantidad de estas células están relacionada directamente con la especie estudiada (Mitchell, 1982).

Por otro lado, los trombocitos en anfibios tienen una función similar a los de reptiles y aves (Levin, 2007; Wright y Whitaker, 2001), por ello es común encontrarlos en pequeñas cantidades (Claver y Quaglia, 2009), como lo observado en el presente estudio.

En anfibios, la respuesta inflamatoria depende de la temperatura y se clasifica de acuerdo con el tipo de célula predominante (Harr et al., 2001). Si las células predominantes son linfocitos se considera como inflamación linfocítica, la cual se asocia a inflamaciones crónicas (Raskin y Meyer, 2001). Las células identificadas en las muestras de líquido de edema provienen de un extravasado sanguíneo (Zachary, 2017).

A su vez, si se observan fagosomas o vacuolas de fagocitación en los leucocitos, debido a fagocitación de bacterias, se considera como inflamación séptica (Campbell, 2007). En concordancia con la literatura citada, se identifica a la respuesta inflamatoria observada en el presente estudio como inflamación linfocítica séptica.

En cuanto a la diferencia del conteo celular según el género del individuo, Gül et al. (2011) identificaron que el recuento de glóbulos rojos en hembras es menor que en machos, mientras que, en términos del conteo leucocitario, no se encontraron diferencias.

En el caso del presente estudio se identificó que las hembras presentaban un mayor porcentaje de eritrocitos y los machos un mayor porcentaje de linfocitos, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el conteo celular según el sexo del individuo.

No obstante, se debe tener en cuenta que para interpretar de mejor manera los resultados obtenidos en citología, se debe realizar exámenes a individuos de la misma especie y sexo (Pessier y Mendelson III, 2017). A su vez, se debe observar una relación entre los datos obtenidos por citología y la caracterización microbiológica y fisicoquímica del líquido, lo cual se observa en el presente estudio.

Caracterización fisicoquímica

El líquido proveniente de cavidad celómica se clasifica como derrame neoplásico, exudado, trasudado modificado y trasudado; dependiendo de la coloración, aspecto, densidad y conteo celular. A los exudados se los puede subclasificar de acuerdo con la presencia de microorganismo (séptico) o ausencia (no séptico) (Alleman y Kupprion, 2007; Vaughan et al., 2006).

Muestras líquidas con una densidad menor a 1.020 g/dl son considerados como trasudados, mientras que muestras con una densidad mayor a 1,020 g/dl pueden ser trasudado modificado, exudado séptico o no séptico y derrame neoplásico (Alleman y Kupprion, 2007; Zachary, 2017).

La clasificación de las muestras de esta investigación concuerda con la descrita en la literatura, teniendo como resultado el 35% de la totalidad concuerda con las características del exudado no séptico, el 40% con las características del exudado séptico y el 25% restante con las características de trasudado.

Así, el causal del síndrome de edema de los individuos que presentan líquido tipo trasudado probablemente se deriva de un desbalance metabólico como la hipoproteinemia (Alleman, 2003).

Estadística

Stockham y Scott indican que idealmente la población muestreada debe ser de al menos 60 individuos (Stockham y Scott, 2008). A pesar de que el presente estudio contó con una muestra menor (20 individuos), los valores de laboratorio obtenidos en el estudio representan al 50% de la población total de individuos *Gastrotheca* que presentan edema en la Balsa de Sapos. Por esta razón, los datos descritos pueden ser tomados como referencia dentro de dicha institución.

Tanto valores normales como valores con variaciones derivadas de patologías pueden estar influenciados por el género (Allender y Fry, 2008). Esto se da debido al dimorfismo sexual presente en anuros; en los individuos del género *Gastrotheca* dicho dimorfismo es mucho más marcado (Del Pino, 1989).

A pesar de ello, en el presente estudio no se encontró una relación entre los resultados estadísticos analizados y el género de los individuos, posiblemente debido al limitado número de muestra. Cabe mencionar que dichas relaciones fueron analizadas por primera vez en el presente estudio, por lo que no se tiene valores de comparación.

Un estudio histopatológico realizado en la misma institución corrobora con lo concluido en el presente estudio, donde se descarta la infección bacteriana como causal del síndrome de edema. Quishpe (2016) identificó que individuos del género *Gastrotheca* que presentaban síndrome de edema presentaban lesiones macroscópicas de tipo congestivo en la mayoría de los órganos, hidronefrosis en riñones y edema en pulmón.

4.4 Limitantes

La literatura que detalla las bacterias propias de la microbiota normal de los anuros es escasa, sólo se conoce de manera general cuales son los grupos bacterianos que pueden estar relacionados con el síndrome de edema. Además, no existen registros que expliquen las diferencias en cuanto a los componentes de la microbiota entre especies de anuros en cautiverio.

De igual manera, existe un número reducido de literatura que especifica las características citológicas normales del género *Gastrotheca*, ya que el tamaño y forma celular varía de acuerdo con la especie de anuro. Debido a la limitada información, en el presente estudio se realizó un análisis de patología comparada con otras especies de anfibios, reptiles y mamíferos.

En cuanto a las técnicas utilizadas para el diagnóstico microbiológico, citológico y fisicoquímico, es necesario mencionar que no se pudo realizar una identificación más específica de los patógenos encontrados debido a limitaciones económicas. A pesar de esto, se llegó a identificar género y especie de la mayoría de bacterias encontradas en el líquido de edema.

Otra de las limitantes de la investigación fue el número de individuos que entraron a estudio y la especie a la que pertenecen. Estos factores fueron delimitados de acuerdo con la disponibilidad por parte de la Balsa de Sapos de la PUCE, el número de individuos presentes en cautiverio y el número de animales que presentaban edema en los meses de muestreo. A su vez, el número de individuos que formaron parte de la investigación limitó el Tamaño de la muestra.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Al caracterizar a nivel microbiológico, citológico y fisicoquímico el líquido proveniente de edema de ranas del género *Gastrotheca* spp., se determinó que el 60% de las muestras presentaban patógenos y el 40% restante de las muestras no.

A su vez, se determinó que, de la totalidad de animales estudiados, el 15% de estos presentaron un grado leve de edema, el 40% un grado de edema moderado y el 45% restante un grado de edema severo. Por otro lado, los dos signos clínicos encontrados con mayor frecuencia fueron monoplejía en el 44% y nubosidad corneal en el 33%.

Caracterización microbiológica

Para identificar a los microorganismos presentes en el líquido proveniente de edema se realizó aislamiento en medios de cultivos y pruebas bioquímicas que permitan su caracterización taxonómica.

Mediante el aislamiento en medios de cultivo, se concluyó que el 30% de las muestras obtenidas presentó crecimiento puro, el 30% crecimiento mixto y el 40% negativo. A la tinción Gram, se identificó que el 22% de las muestras fueron cocos Gram positivos y el 78% restante fueron bacilos Gram negativos. El 50% de las bacterias encontradas pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*.

Por otro lado, las pruebas bioquímicas utilizadas para la caracterización taxonómica de bacterias dieron como resultado el 11% de las bacterias encontradas identificadas como *Klebsiella ozaenae*, 11% *Burkholderia pseudomallei*, 17% *Enterococcus*. Se identificó en menor cantidad (5,6%) las siguientes bacterias *Streptococcus*, *Yersinia enterocolitica*, *Pasteurella haemolitica*, *Hafnia alvei*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter gergoviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella arizonae* y *Enterobacter agglomerans*.

Se concluyó que la presencia de estas bacterias no es el causal principal del síndrome de edema, infección de tipo secundaria, siendo producto de una patología primaria no identificada. Se sugiere que la causa del síndrome se deriva del manejo en cautiverio y problemas metabólicos de los individuos estudiados.

Caracterización citológica

La cuantificación de las células presentes en el líquido de edema sugiere que no existen patologías parasitarias, fúngicas o virales en los individuos estudiados. Sin embargo, se deben realizar más estudios para corroborar este enunciado. Teniendo como resultado una inflamación linfocítica derivada de una inflamación crónica.

Del total de las muestras analizadas, el 30% de las muestras no presentaron componentes celulares, mientras que el 70% restante sí. Las células identificadas con mayor frecuencia fueron linfocitos con el 60,1%, eritrocitos con el 29,3% y neutrófilos con el 4,54%.

No se encontraron diferencias significativas en el conteo celular en relación con el sexo del individuo. A pesar de esto, se debe mencionar que las hembras presentaban mayor porcentaje de eritrocitos y los machos un mayor porcentaje de linfocitos.

Caracterización Físicoquímica

En cuanto a las principales propiedades del líquido de edema, el 100% de las muestras presentó un pH 8. A su vez, el promedio de la densidad fue de 1,22 g/dl. En cuanto a la coloración del líquido, el 50% de las muestras fue incolora y el 50% restante colora. A la clasificación del estado de turbidez del líquido se identificó que el 70% de las muestras fue nítido, el 25% fue poco nítido y el 5% fue turbio.

Los resultados mencionados con anterioridad fueron la base para realizar la clasificación del líquido, teniendo como resultado el 35% de la totalidad concuerda con las características del exudado no séptico, el 40% con las características del exudado séptico y el 25% restante con las características de trasudado.

Estadística inferencial

En los gráficos de correlación de Pearson y relación lineal no se encontró una relación entre las variables analizadas (peso y circunferencia abdominal) y el género de los individuos. Sin embargo, es necesario recalcar que el número de individuos muestreados fue limitado por lo que se aconseja realizar el mismo estudio en una muestra mayor.

De igual forma, al analizar los datos obtenidos en el conteo celular con relación al sexo de los individuos, mediante la prueba de Mann-Whitney, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Por lo que la presencia celular, y por ende el tipo de reacción inflamatoria, no están ligados con el sexo del individuo.

5.2 Recomendaciones

La presente investigación plantea las bases para en un futuro explorar a mayor profundidad las características del líquido proveniente de edema en anuros, enfatizando en la realización de estudios con mayor número de individuos y de diferentes especies con grados de extinción.

Debido a la escasez de información sobre la microbiota normal de anfibios, es necesario realizar estudios que caractericen los componentes bacterianos normales del líquido de cavidad celómica, tomando en cuenta las diferencias observadas entre especies de anuros.

Puesto que en el presente estudio no se realizó la identificación bacteriana, género y especie, de la totalidad de patógenos encontrados en el líquido de edema, se expone la necesidad de realizar pruebas de identificación más específicas como por ejemplo PCR.

De igual forma, es necesario crear bases de datos que permitan conocer las características celulares propias de las especies a estudiar. Esto facilitará el reconocimiento de la morfología normal de dichas células y a su vez, generará un diagnóstico patológico más efectivo.

Para llegar a un diagnóstico más preciso, se recomienda realizar estudios complementarios en los animales a estudio, como por ejemplo coproparasitario, hematología, entre otros.

A su vez, es necesario realizar seguimiento para valorar el manejo en cautiverio y descartar posibles contaminaciones secundarias derivadas del agua o por contacto con otros especímenes, y problemas metabólicos debido a la dieta, temperatura y humedad.

REFERENCIAS

- Aguilar, R., Hernández, S., Divers, S., & Perpiñan, D. (2010). Atlas de Medicina de Animales Exóticos (2da ed.). Buenos Aires, Argentina: Inter-Medica.
- Alleman, R. (2003). Abdominal, thoracic, and pericardial effusions. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 33(1), 89-118.
- Alleman, R. y Kupprion, E. (2007). Cytologic Diagnosis of Diseases in Reptiles. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 10(1), 155-186.
- Allender, M. y Fry, M. (2008). Amphibian Hematology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 11(3), 463-480.
- Angulo, A., Rueda-Almonacid, J., Rodriguez-Mahecha, J. y La Marca, E. (2006). Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina (Vol. 2). Bogotá, Colombia: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Berger, L. (2001). Diseases in Australian frogs. (PhD), James Cook University, Australia.
- Bertelsen, M. y Crawshaw, G. (2003). 5-minute Guide to Amphibian Disease. *Exotic DVM*, 5(2), 23-26.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608.
- Bresciano, J., Salvador, C., Paz-y-Miño, C., Parody-Merino, A., Bosch, J. y Woodhams, D. (2015). Variation in the Presence of Anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* Bacteria of Amphibians Across Life Stages and Elevations in Ecuador. *EcoHealth*, 12(2), 310-319.
- Cabagna, M., Lajmanovich, R., Attademo, A., Peltzer, P., Junges, C., Fiorenza, G. y Bassó, A. (2014). Generalidades sobre la hematología de anfibios anuros. Museo provincial de ciencias naturales "Florentino Amaghino", 18(1), 1-18.
- Cabagna, M., Lajmanovich, R., Stringhini, G., Sanchez-Hernandez, J. y Peltzer, P. (2005). Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. *Applied Herpetology*, 2(4), 373-380.
- Campbell, T. (2007). Basics of Cytology and Fluid Cytology. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 10(1), 1-24.

- Campbell, T. y Ellis, C. (2007). Avian and exotic animal hematology and cytology (3ra ed.). Ames, USA: Blackwell Publishing.
- Campos, J., Grajales, M., López, V., Morales, N. y Yepes, E. (2011). Mecanismo de regulación ácido-básico, exudados y trasudados. *Bioquímica clínica especializada*.
- Cecil, T. (2006). Amphibian Renal Disease. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 9(1), 175-188.
- Çiçek, K. y Arıkan, H. (2010). Morphology of peripheral blood cells from various species of Turkish Herpetofauna. *Acta Herpetológica*, 5(2), 179-198.
- Claver, J. y Quaglia, A. (2009). Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18(2), 87-97.
- Clayton, L. y Gore, S. (2007). Amphibian Emergency Medicine. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 10(2), 587-620.
- Coloma, L. (1991). Anfibios del Ecuador: Lista de especies, ubicación altitudinal y referencias bibliográficas. Quito, Ecuador: EcoCiencia.
- Coloma, L., Ron, S., Morales, M. y Almeida, D. (2004a). *Gastrotheca litonedis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T55342A11295890. Retrieved 23 de octubre del 2017, from <http://www.iucnredlist.org/details/55342/0>
- Coloma, L., Ron, S., Morales, M. y Almeida, D. (2004b). *Gastrotheca pseustes*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T55354A11297954. Retrieved 23 de octubre del 2017, from <http://www.iucnredlist.org/details/55354/0>
- Coloma, L., Ron, S., Morales, M. y Almeida, D. (2004c). *Gastrotheca riobambae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T55357A11298345. Retrieved 23 de octubre del 2017, from <http://www.iucnredlist.org/details/55357/0>
- Cowell, R. y Valenciano, A. (2014). Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the dog and cat (4ta ed.). St. Louis, USA: Elsevier.
- Crawshaw, G. (1992). Amphibian medicine. In R. Kirk, J. Bonagura & O. C. (Eds.), *Current Veterinary Therapy*. Philadelphia, USA: Saunders Company.
- Curtis, H., Barnes, S., Schneker, A., & Massarini, A. (2008). *Biología* (7ma ed.). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Del Pino, E. (1989). Modifications of oogenesis and development in marsupial frogs. *Development*, 107(2), 169-187.

- Densmore, C. y Green, D. (2007). Diseases of Amphibians. *ILAR Journal*, 48(3), 235-254.
- Duellman, W. (2015). Marsupial frogs: *Gastrotheca* and allied genera. Maryland, USA: Johns Hopkins University Press.
- Duellman, W. y Hillis, D. (1987). Marsupial frogs (*Anura: Hylidae: Gastrotheca*) of the ecuadorian Andes: Resolution of taxonomic problems and phylogenetic relationships. *Herpetologica*, 43, 141-173.
- Fowler, H. (1913). Amphibians and reptiles from Ecuador, Venezuela, and Yucatan. *Proceedings Academic National Science*, 65(2), 157-160.
- Garner, M. (2012). Diseases of Amphibians. *Pathology of Laboratory Animals*. Blacksburg, VA.: C.L. Davis Symposium.
- Gül, C., Tosunoğlu, M., Erdoğan, D. y Özdamar, D. (2011). Changes in the blood composition of some anurans. *Acta Herpetológica*, 6(2), 137-147.
- Harr, K., Alleman, A., Dennis, P., Maxwell, L., Lock, B., Bennett, R. y Jacobson, E. (2001). Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells and hematologic and plasma biochemical reference ranges in green iguanas. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(6), 15-21.
- Heinz-Taheny, K. (2009). Cardiovascular Physiology and Diseases of Amphibians. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 12(1), 39-50.
- IUCN. (2017). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-2. . Retrieved 24 de octubre del 2017, from <http://www.iucnredlist.org>
- Klaphake, E. (2009). Bacterial and Parasitic Diseases of Amphibians. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 12(3), 597-608.
- Kolias, G. (1984). Immunologic aspects of infectious diseases. In G. Hoff, F. Frye y E. Jaconson (Eds.), *Diseases of amphibians and reptiles*. New York, USA: Plenum Press.
- Levin, J. (2007). The evolution of mammalian platelets. In A. Michelson (Ed.), *Platelets* (pp. 4-22). USA: Academic Press.
- Li, J., Barreda, D., Zhang, Y., Boshra, H., Gelman, A., LaPatra, S. y Sunyer, J. (2006). B-lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature Immunology*, 7, 16-24.
- Mader, D. (2006). *Reptile medicine and surgery* (2da ed.). St. Louis, USA: Elsevier.

- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A. y Maguire, D. (2013). *Clinical veterinary microbiology* (2da ed.). Toronto, Canadá: Elsevier.
- Mauel, M., Miller, D., Frazie, K. y Hines, M. (2002). Bacterial Pathogens Isolated from Cultured Bullfrogs (*Rana Castesbeiana*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14(5), 431-433.
- Microgen-Bioproducts-Ltd. (2004). Microgen™ GnA+B-ID System. Reino Unido.
- Miller, D., Rajeev, S., Brookins, M., Cook, J., Whittington, L. y Baldwin, C. (2008). Concurrent Infection with *Ranavirus*, *Batrachochytrium dendrobatidis*, and *Aeromonas* in a Captive Anuran Colony. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 39(3), 445-449.
- Mitchell, J. (1982). The effect of host age on *Rana temporaria-gorgoderina vitelliloba* interactions. *International Journal for Parasitology*, 12(6), 601-604.
- Montalvo, C. (2010). *Técnica histológica*. México: Universidad Autónoma de México.
- Montel, G., Pasteris, S., Ale, C., Otero, M., Bühler, M. y Nader-Macías, M. (2012). Cultivable microbiota of *Lithobates catesbeianus* and advances in the selection of lactic acid bacteria as biological control agents in raniculture. *Research in Veterinary Science*, 93(3), 1160-1167.
- Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2013). *Microbiología Médica* (7a ed.). Barcelona, España: Elsevier.
- Ochoa, J., Roque, A., & Daza, J. (2012). Colangiocarcinoma hepático en un felino y hallazgos anatomopatológicos, y clínicos compatibles con peritonitis infecciosa felina. *Revista MVZ Córdoba*, 17(2), 3080-3086.
- Pasteris, S., Buhler, M. y Nader-Macías, M. (2006). Microbiological and histological studies of farmed-bullfrog (*Rana catesbeiana*) tissues displaying red-leg syndrome. *Elsevier*, 251(1), 11-18.
- Pessier, A. (2007). Cytologic Diagnosis of Disease in Amphibians. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 10(1), 187-206.
- Pessier, A. (2009). Edematous Frogs, Urinary Tract Disease, and Disorders of Fluid Balance in Amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18(1), 4-13. doi: <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2008.10.003>
- Pessier, A. y Mendelson III, J. (2017). *A Manual for Control of Infectious Diseases in Amphibian Survival Assurance Colonies and Reintroduction Programs* (Vol. Ver. 2.0.). Apple Valley, MN: IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group.

- Pessier, A., Nichols, D., Longcore, J. y Fuller, M. (1999). Cutaneous Chytridiomycosis in Poison Dart Frogs (*Dendrobates* spp.) and White's Tree Frogs (*Litoria Caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(2), 194-199.
- Pessier, A. (2002). An overview of amphibian skin disease. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 11(3), 162-174.
- Pessier, A. y Pinkerton, M. (2003). Practical gross necropsy of amphibians. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 12(2), 81-88.
- PUCE. (2006). Balsa de Sapos. Retrieved 10 de septiembre del 2017, from <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/BalsaSapos/QuienesSomos.aspx>
- Quinn, P., Markey, B., Leonard, F., FitzPatrick, E., Fanning, S. y Hartigan, P. (2011). *Veterinary microbiology and microbial disease* (2a ed.). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Quishpe, P. (2016). Caracterización histopatológica de órganos afectados por el síndrome de edema en ranas de la especie *Gastrotheca* spp. provenientes de cautiverio de la institución Balsa de Sapos. (Pregrado), Universidad de las Américas, Quito, Ecuador.
- Raskin, R. y Meyer, D. (2001). *Atlas of canine and feline cytology*. Philadelphia, USA: WB Saunders.
- Reavill, D. (2001). Amphibian Skin Diseases. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 4(2), 413-440.
- Rojas, N., Chaves, E. y García, F. (2006). *Bacteriología Diagnóstica* (1ra ed.). San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica Facultad de Microbiología.
- Ron, S. (2008). La diversidad de la vida: entre la debacle y el anonimato. *Ecuador Terra Incógnita*, 53, 32 - 38.
- Ron, S., Guayasamin, J., Yanez-Muñoz, M., Merino-Viteri, A., Ortiz, D. y Nicolalde, D. (2016). AmphibiaWebEcuador. Version 2016.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Retrieved 22 de octubre del 2017, from <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios/AnfibiosEcuador/Default.aspx>
- Ross, M. y Pawlina, W. (2007). *Histología Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular* (5ta ed.). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Schumacher, J. (2006). Selected Infectious Diseases of Wild Reptiles and Amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 15(1), 18-24.

- Sharma, V., Kaura, Y. y Singh, I. (1974). Frogs as carriers of *Salmonella* and *Edwardsiella*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40(1), 171-175.
- Sheafor, B., Davidson, E., Parr, L. y Rollins-Smith, L. (2008). Antimicrobial peptide defenses in the salamander, *Ambystoma tigrinum*, against emerging amphibian pathogens. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(2), 226-236.
- Speare, R., Freeland, W. y Bolton, S. (1991). A Possible *Iridovirus* in Erythrocytes of *Bufo marinus* in Costa Rica. *Journal of Wildlife Diseases*, 27(3), 457-462.
- Stockham, S. y Scott, M. (2008). *Fundamental of Veterinary Clinical Pathology* (2da ed.). Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Terio, K. (2004). Comparative Inflammatory Responses of Non-Mammalian Vertebrates 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP). Orlando, USA.
- Turner, R. (1988). Amphibians. In A. Rowley y N. Ratcliffe (Eds.), *Vertebrate Blood Cells* (pp. 129-209). Cambridge, UK: Cambridge University.
- Valencia, J. y Garzón, K. (2011). *Guía de anfibios y reptiles en ambientes cercanos a las Estaciones del OCP* (1a ed.). Quito, Ecuador: Fundación Herpetológica Gustavo Orcés.
- Valencia, J., Toral, E., Morales, M., Betancour, R. y Barahona, A. (2008). *Guía de campo de anfibios del Ecuador*. Quito, Ecuador.
- Vaughan, R., Vitali, S., Payne, K. y Eden, P. (2006). A Splendid Tree Frog with Edema Syndrome and Intestinal Adenocarcinoma. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 9(3), 583-587.
- Verdín, S., Moreno, L., Rojo, N., García, A., Omaña, M., Meneses, A. y Nieto, O. (2013). *Histología e Inmunohistoquímica manual de métodos*. México D.F., México Universidad Nacional Autónoma de México.
- Villier, E. y Blackwood, L. (2013). *Manual de diagnóstico de laboratorio en pequeños animales*. Barcelona, España: Ediciones S.
- Wright, K. y Whitaker, B. (2001). *Amphibian medicine and captive husbandry* (1ra ed.). Malabar, USA: Krieger Publishing Company.
- Zachary, J. (2017). *Pathologic basis of veterinary disease* (6ta ed.). St. Louis, USA: Elsevier.

ANEXOS

Anexo 1: Mapas de distribución geográfica en el Ecuador de *G. pseustes*, *G. riobambae* y *G. litonedis*.



Gastrotheca pseustes



Gastrotheca riobambae



Gastrotheca litonedis

Anexo 2: Clasificación del tipo de líquido de acuerdo con los datos identificados por individuo.

Individuo	Sexo	Bacterias	Células	Color	Aspecto	pH	Tipo de líquido
1	Hembra	Si	Si	Coloro	Poco nítido	8	Exudado no séptico
2	Macho	Si	Si	Coloro	Poco nítido	8	Exudado no séptico
3	Macho	Si	Si	Incoloro	Nítido	8	Trasudado
4	Macho	No	Si	Coloro	Turbio	8	Exudado séptico
5	Hembra	Si	Si	Coloro	Poco nítido	8	Exudado no séptico
6	Macho	Si	Si	Coloro	Nítido	8	Exudado no séptico
7	Macho	Si	No	Incoloro	Nítido	8	Trasudado
8	Hembra	No	No	Incoloro	Poco nítido	8	Exudado séptico
9	Macho	Si	No	Coloro	Nítido	8	Trasudado
10	Macho	No	No	Incoloro	Nítido	8	Exudado séptico
11	Hembra	No	Si	Incoloro	Nítido	8	Exudado séptico
12	Hembra	No	Si	Incoloro	Poco nítido	8	Exudado séptico
13	Macho	No	Si	Incoloro	Nítido	8	Exudado séptico
14	Hembra	Si	Si	Coloro	Nítido	8	Exudado no séptico
15	Macho	Si	Si	Coloro	Nítido	8	Exudado no séptico
16	Hembra	No	No	Incoloro	Nítido	8	Exudado séptico
17	Hembra	Si	Si	Incoloro	Nítido	8	Trasudado
18	Macho	No	Si	Incoloro	Nítido	8	Exudado séptico
19	Hembra	No	No	Coloro	Nítido	8	Trasudado
20	Hembra	No	Si	Coloro	Nítido	8	Exudado no séptico

Anexo 3: Grado de edema de cada uno de los individuos según los datos recopilados.

Individuo	Especie	Sexo	Identificación	Peso (g)	CA (mm)	LRC (mm)	Grado de edema
1	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Hembra	T709	30	122	63	Severo
2	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Macho	T1576	20	112	59	Severo
3	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Macho	T1681	49	114	62	Moderado
4	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Macho	T705	17	110	65	Moderado
5	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Hembra	T1356	15	88	48	Leve
6	<i>Gastrotheca riobambae</i>	Macho	T2517	8	74	49	Moderado
7	<i>Gastrotheca riobambae</i>	Macho	T2331	23	94	61	Leve
8	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hembra	T1132	25	132	58	Moderado
9	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Macho	T3002v	13	98	62	Moderado
10	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Macho	T3002c	9	108	65	Moderado
11	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Hembra	T473	4	144	52	Severo
12	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Hembra	T1670	38	126	51	Severo
13	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Macho	T1375	9	102	39	Severo
14	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hembra	T1498	10	116	39	Leve
15	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Macho	T1650	8	108	37	Moderado
16	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hembra	T1199o	13	132	52	Severo
17	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hembra	T1199c	15	128	53	Moderado
18	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Macho	T1131v	11	116	61	Severo
19	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hembra	T1131c	18	160	83	Severo
20	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hembra	T456	8	118	56	Severo

