

Tesis de Posgrado

Desarrollo y evolución de la Pars Distalis Hipofisaria y de las glándulas tiroides durante la metamorfosis de Bufo arenarum

Miranda, Leandro Andrés

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Miranda, Leandro Andrés. (1995). Desarrollo y evolución de la Pars Distalis Hipofisaria y de las glándulas tiroides durante la metamorfosis de Bufo arenarum. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2709_Miranda.pdf

Cita tipo Chicago:

Miranda, Leandro Andrés. "Desarrollo y evolución de la Pars Distalis Hipofisaria y de las glándulas tiroides durante la metamorfosis de Bufo arenarum". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2709_Miranda.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**DESARROLLO Y EVOLUCION DE LA PARS DISTALIS HIPOFISARIA Y DE
LAS GLANDULAS TIROIDES DURANTE LA METAMORFOSIS DE *Bufo
arenarum*.**

Lic. Leandro Andrés Miranda

Director: Dr. Armando Pisanó

**Lugar de trabajo: Laboratorio de Investigaciones Embriológicas
(LABINE) (CONICET).**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias
Biológicas.**

1995

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Pisanó por haberme guiado en la realización de este trabajo ofreciéndome siempre todos sus conocimientos científicos, técnicos y humanos.

A la Dra. Graciela Esnal, quien como consejera de estudios supo sugerirme y alentarme durante el desenvolvimiento de mi Carrera Doctoral.

Al Dr. Dante Paz con quien he compartido y disfrutado mis primeros pasos en la Investigación Científica, pero fundamentalmente por brindarme su amistad.

A todo el personal del LABINE que durante estos cinco años de convivencia siempre me brindó su apoyo y amistad.

Al Dr. Víctor Casco y al personal del Departamento de Microscopía electrónica, Facultad de Bioingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, por su inestimable colaboración en el uso del Microscopio electrónico de Transmisión.

Al Dr. Affani, al Lic. Rubén Dezi y al personal del I.N.E.U.C.I. por su valiosa ayuda en el uso del Analizador de Imágenes.

Al Dr. Francisco Gracia Navarro, Dr. Socorro García Navarro, Dr. Antonio Ruiz Navarro y al personal del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Córdoba (España), por su desinteresado asesoramiento.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, que a través del otorgamiento de sucesivas Becas, me suministró los medios necesarios para llevar a cabo mi labor científica.

A todos mis amigos y familiares quienes soportaron mis crisis existenciales, por apoyarme y acompañarme aunque no comprendiesen mi labor.

A las larvas de *Bufo arenarum*.

PENSAR ES UN ARTE, NO UNA CIENCIA.

Lin Yutang (El Arte de vivir)

INDICE

I.	INTRODUCCION.....	3
I.1.	Generalidades.....	3
I.2.	Hipófisis.....	8
I.3.	Tiroides.....	22
I.4.	Hormonas adenohipofisarias y el control endócrino de la metamorfosis de anfibios.....	35
II.	OBJETIVOS.....	51
III.	MATERIALES Y METODOS.....	54
III.1.	Material biológico.....	54
III.2.	Métodos de estudio.....	60
III.3.	Morfometría y estereología.....	66
III.4.	Análisis estadístico.....	71
IV.	RESULTADOS.....	72
IV.1.	Desarrollo y evolución de la pars distalis y las glándulas tiroides en condiciones normales.....	72
IV.1.1.	Morfométricos corporales.....	72
IV.1.2.	Inmunocitoquímicos y morfométricos pars distalis...	74
IV.1.3.	Morfométricos tiroides.....	96
IV.1.4.	Ultraestructurales tiroides.....	106
IV.2.	Efecto del goitrógeno perclorato de potasio en el desarrollo y evolución de la pars distalis y de las glándulas tiroides.....	109
IV.2.1.	Morfométricos corporales.....	109
IV.2.2.	Inmunocitoquímicos y morfométricos pars distalis..	113
IV.2.3.	Morfométricos tiroides.....	131
IV.2.4.	Ultraestructurales tiroides.....	140
V.	DISCUSION.....	146
V.1.	Desarrollo y evolución de la pars distalis y las glándulas tiroides en condiciones normales.....	146
V.1.1.	Modificación del tamaño de los animales.....	146
V.1.2.	Evolución anatómica de la pars distalis.....	147
V.1.3.	Identificación inmunocitoquímica de las células de la pars distalis.....	150
V.1.4.	Evolución de los parámetros morfométricos de la pars distalis.....	153
V.1.5.	Evolución anatómica de las tiroides.....	159

V.1.6.	Evolución de los parámetros morfométricos de las tiroides.....	159
V.2.	<i>Efecto del goitrógeno Perclorato de potasio en el desarrollo y evolución de la pars distalis y de las glándulas tiroides.....</i>	<i>163</i>
V.2.1.	Modificación del tamaño de los animales.....	163
V.2.2.	Evolución anatómica de la pars distalis.....	165
V.2.3.	Identificación inmunocitoquímica de las células de la pars distalis.....	166
V.2.4.	Evolución de los parámetros morfométricos de la pars distalis.....	167
V.2.5.	Evolución de los parámetros morfométricos de las tiroides.....	170
VI.	CONCLUSIONES.....	172
VII.	TABLAS.....	175
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	189
IX.	PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS.....	208

INTRODUCCION

I. INTRODUCCION.

I.1. Generalidades.

Hace unos 280 millones de años, al final del Devónico, un pez con aletas semejantes a patas y provisto de pulmones rudimentarios sobrevivió al paso terrestre entre charcas medio secas. Tras millones de años de vida acuática, este pudo haber sido el primer paso en la lenta colonización del medio terrestre por parte de los vertebrados.

La transición de peces a anfibios llevó millones de años y tuvo lugar siguiendo fases muy lentas. En la mayoría de los anfibios actuales existe una transición similar en un período concreto del ciclo vital: *la metamorfosis*.

El desarrollo embrionario en anfibios comienza con la activación del ovocito por la presencia del espermatozoide. En la mayoría de los anfibios ocurre en el agua, donde las gametas son depositadas. Luego de la eclosión (momento en que el embrión por medio de movimientos musculares se libera de la membrana de fecundación), los embriones se transforman en larvas nadadoras y a través de la metamorfosis adoptarán la forma adulta definitiva que les permitirá vivir fuera del agua, si bien los adultos en la mayoría de los casos volverán al medio acuático para reproducirse.

La evolución implica una serie de adaptaciones al medio por parte de generaciones sucesivas de organismos que presentan mutaciones genéticas favorables. Por su parte la

metamorfosis es una adaptación directa, un desarrollo transicional desde una forma larvaria, especializada para vivir en un medio ambiente acuático, a una forma adulta adaptada al medio terrestre o semiterrestre (Frieden, 1963). En un corto período de tiempo la larva debe sufrir una serie de transformaciones estructurales, fisiológicas, bioquímicas y de comportamiento que harán que este ser pisciforme, con cola, respiración branquial, excreción amoniotética y alimentación herbívora se transforme en un adulto, de respiración pulmonar y cutánea, excreción uricotética y hábitos alimentarios carnívoros.

En la actualidad la clase *Amphibia* se divide en tres órdenes: Anura, Urodela y Apoda. Si bien los tres grupos presentan o manifiestan modificaciones relacionadas con el proceso metamórfico, es en los anuros en donde estos cambios son mayores y, por lo tanto, se hacen más evidentes.

Los cambios metamórficos son de tres tipos: en primer lugar, la regresión de estructuras y funciones que son sólo significativas en la larva; al mismo tiempo la transformación de estructuras larvarias en otras útiles para el adulto y, por último, el desarrollo de nuevas estructuras y funciones esenciales para el adulto. Estos cambios, que son más evidentes en anuros que en urodelos, se presentan en una secuencia ordenada de cronología definida durante la vida larvaria, representando la parte más llamativa y estudiada del desarrollo de anfibios.

La mayoría de los autores (Taylor y Kollros, 1946; Cambar y Marrot, 1954; Cambar y Gipouloux, 1956, Gosner, 1960) coinciden en agrupar los acontecimientos que tienen lugar durante el desarrollo de anfibios en dos grandes períodos:

1.- Período embrionario: Comprende desde el momento de la fecundación hasta la aparición de una larva con branquias internas.

2.- Período larvario: Se inicia en el momento en que hacen su aparición los esbozos de los miembros posteriores y termina con la culminación de la metamorfosis.

A su vez el desarrollo postembrionario de los anuros fue separado por Etkin (1964, 1968) en tres específicas fases: premetamorfosis, prometamorfosis y clímax metamórfico.

Premetamorfosis: Considerado como el verdadero período larvario. Comenzaría con la aparición de los esbozos de los miembros posteriores. Presente sólo en anuros, se caracteriza por un crecimiento considerable de la larva y por el gran desarrollo de sus estructuras sin que existan cambios metamórficos; sin embargo los miembros posteriores no presentan un gran desarrollo.

Prometamorfosis: Durante esta etapa continúa el crecimiento de la larva. Lo más significativo de este período es el crecimiento y desarrollo de los miembros posteriores, produciéndose algunos cambios metamórficos menores tales como

la reabsorción de la pieza cloacal, característica que señala el final de esta etapa.

Clímax metamórfico: En esta fase se producen los cambios aparentes más drásticos: Emergencia de los miembros anteriores, cambia la forma general del cuerpo, se amplía la boca y ocurre la regresión de la cola. Además de estos cambios reconocibles en la forma externa, se producen profundas alteraciones en la anatomía interna que involucran en mayor o menor grado a todos los órganos y tejidos; en particular al esqueleto, musculatura, intestino, riñón, células sanguíneas y piel. Paralelamente también ocurren cambios bioquímicos, comportamentales y fisiológicos para anticipar la transición del medio acuático al terrestre. Se considera finalizado cuando se ha completado la reabsorción de la cola, resultando un ejemplar similar al adulto pero de menor tamaño.

Hasta 1912 e incluso en décadas posteriores, el estudio del desarrollo de anfibios y más concretamente de la metamorfosis fue exclusivamente descriptivo. A partir de esta fecha se asiste a un cambio trascendental cuando Gudernatsch (1912, 1914), al investigar la capacidad relativa que diversos tejidos de caballo podrían tener como potenciadores del crecimiento, alimentó con ellos a renacuajos de *Rana temporaria*. Observó que la administración de la glándula tiroidea provocaba el clímax metamórfico, incluso en animales premetamórficos. Este descubrimiento, cuya importancia ha

sido subestimada, supuso el reconocimiento de la funcionalidad de un órgano endócrino en animales poiquiloterms.

Estudios posteriores (Allen, 1916, 1918, 1920; Smith 1916) confirmaron el control ejercido por la pars distalis adenohipofisaria sobre la glándula tiroidea. Se estableció de esta manera que la metamorfosis está controlada directamente por la tiroides e indirectamente por la pars distalis, vía hormona tireotropa; asimismo se evidenció que los procesos metamórficos no tienen lugar si alguna de estas glándulas presenta una disfunción patológica experimental.

Durante años el estudio endócrino de la metamorfosis se limitó únicamente al papel ejercido por estas dos glándulas. Más recientemente se ha observado la implicación de otras estructuras endócrinas como del hipotálamo y de las hormonas hipofisarias promotoras del crecimiento. Así mismo se ha evidenciado la relación de la glándula interrenal, el cuerpo ultimobranquial, el páncreas endócrino y, posiblemente, la glándula pineal en la regulación de la metamorfosis, que se presenta como un ejemplo prominente de integración endócrina.

Cabe destacar también que numerosas variables ambientales y biológicas afectan el crecimiento y la metamorfosis de los anuros, ya que todas las hormonas involucradas en estos procesos operan influenciadas por la luz, (Guyetant, 1964; Eichler y Gray, 1976; Wright *et al.*, 1988) la temperatura (Smith-Gill y Berven, 1979; Hota y Dash, 1986; Miranda *et*

al., 1993a) y otras variables como ser densidad poblacional (Collins, 1979; Dash y Hota, 1980; Miranda, 1993b) o el alimento disponible (Steinwascher y Travis, 1983; Licht, 1967).

1.2. Hipófisis.

En la evolución de los cordados aparece una encrucijada morfofuncional en las rutas de información implicadas en la homeostasis. En esta encrucijada, la hipófisis o glándula pituitaria, va a ser la responsable de la coordinación entre el sistema nervioso central y el resto del sistema endócrino mediante relaciones de tipo "feedback" que conseguirán mantener estabilizado el medio interno. A su vez, las zonas neuroendócrinas de la hipófisis permiten a las estructuras internas corporales adaptarse a los cambios ambientales externos.

El valor de supervivencia de tal conexión no puede ser subestimado. Si consideramos que el conocimiento que poseemos de nuestro medio ambiente lo obtenemos vía sistema nervioso y que la mayoría de los ajustes metabólicos están controlados por hormonas circulantes en sangre, concluiremos que, sin un nexo de unión entre los dos sistemas, operaríamos en un vacío ambiental.

En anfibios, el estudio de la hipófisis y más concretamente de la adenohipófisis presenta además un doble

interés: por una parte el interés intrínseco de manifestaciones morfofuncionales tan llamativas como la metamorfosis, el ciclo sexual y el cambio de color y, por otra parte, la condición de este grupo de vertebrados de ser los primeros cordados que intentan con éxito la conquista del medio terrestre.

Al igual que ocurre en el resto de los vertebrados, la hipófisis de anfibios presenta un doble origen: ectodérmico y nervioso. En el embrión, en el estadio de botón caudal, se observa una invaginación sólida del ectodermo en la región frontal de la cabeza próxima a las fosetas olfativas. Este esbozo pierde pronto su contacto con la región del estomodeo, emigrando en dirección caudal entre el prosencéfalo y el techo faríngeo hasta contactar con un divertículo ventral del diencéfalo: el proceso infundibular. En el esbozo ectodérmico se observan células con núcleos grandes que no presentan una distribución definida. Por su parte, las células infundibulares que originarán la neurohipófisis se organizan formando un epitelio que reviste el tercer ventrículo (Kerr, 1939, 1966; van Oordt, 1974; Doerr-Schott, 1968b; Reyrel, 1970).

En el momento de la eclosión, las células que componen la adenohipófisis sufren una reorganización que implica una transformación de la forma externa del primordio y una separación interna en dos compartimentos, la pars intermedia

y la pars distalis, caracterizadas por ordenamientos celulares diferentes (Nyholm, 1977).

Durante los primeros estadios de la premetamorfosis quedan establecidas definitivamente las distintas zonas de la hipófisis. Por una parte, la region posterior de la neurohipófisis aumenta de volúmen dando lugar a la pars nervosa, mientras que la región anterior, origina la eminencia media. Por su parte en el lóbulo ectodérmico se definen tres formaciones: bajo la eminencia media se sitúa la pars distalis y bajo la pars nervosa se encuentra la pars intermedia en posición dorso caudal con respecto a la pars distalis. La pars tuberalis, formada por células que poseen gránulos de naturaleza proteica en su citoplasma, se sitúa en posición rostro ventral formando dos pequeñas agrupaciones celulares a ambos lados de la pars distalis en la zona de contacto con la eminencia media (Reyrel, 1970).

A lo largo del desarrollo, la pars distalis crece llamativamente y su porción dorso caudal se desplaza hacia atrás bajo la pars intermedia, la cual adopta posiciones más craneales. Al mismo tiempo la zona rostral de la pars distalis se une estrechamente a la eminencia media desde la cual crecen los vasos del sistema porta hipofisario (Green, 1947). El resto del lóbulo se extiende en direcciones caudal y lateral hasta adquirir forma discoidal (van Oordt, 1974). En la *figura 1*, se esquematiza en secciones sagitales, el desarrollo de la región hipofisaria en distintos anuros.

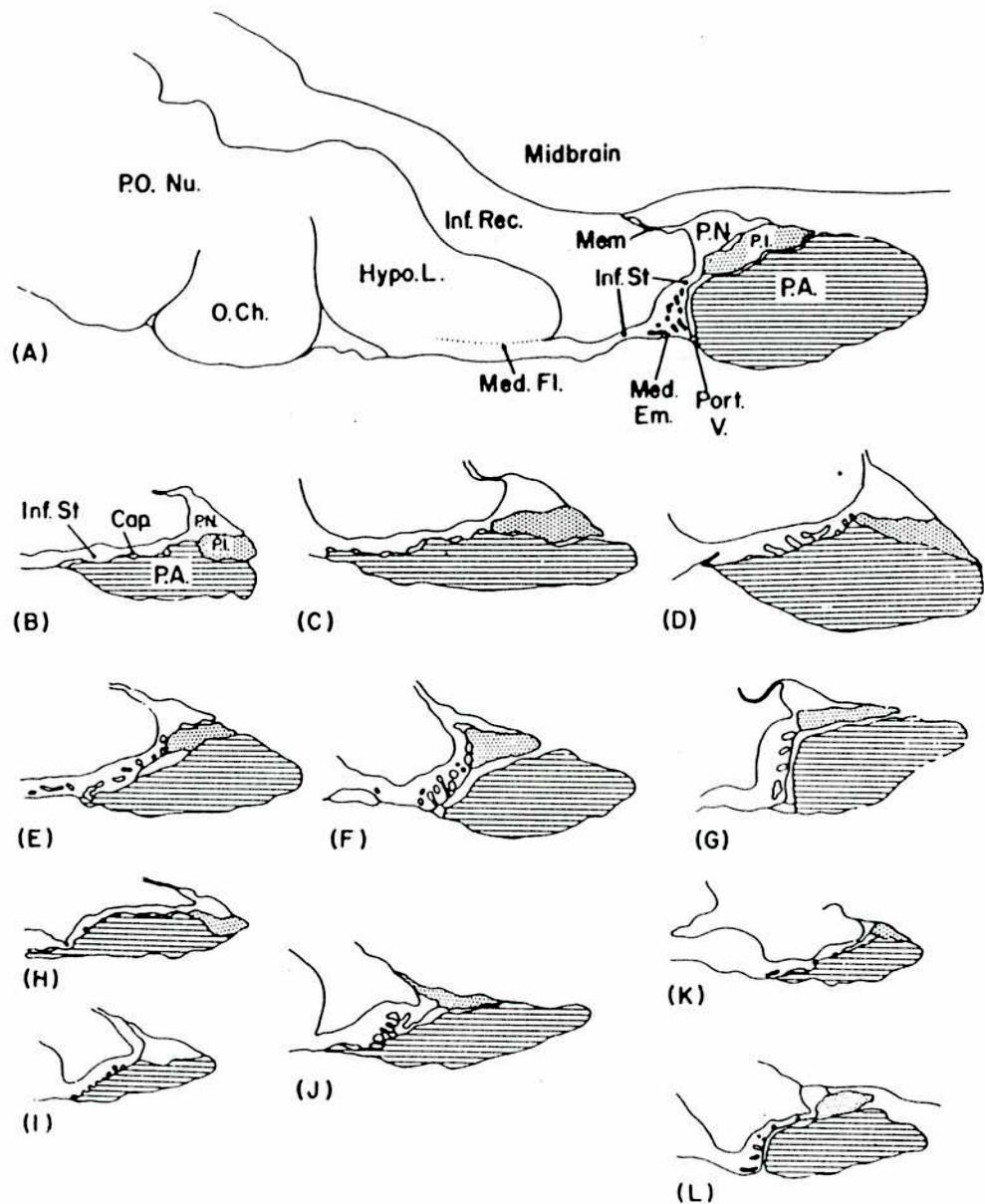


Fig. 1 Esquemas de secciones sagitales de la región hipofisaria de: A, rana adulta; B larva en premetamorfosis; C, premetamorfosis tardía; E, principio de clímax; F, mitad del clímax; G, después del clímax (*Rana pipiens*); H, premetamorfosis temprana; I, premetamorfosis tardía; J, un día después del inicio del clímax (*Rana sylvatica*); K, mitad premetamorfosis; L, clímax temprano (*Bufo americanum*). Cap., capilares; Hypo. L., lóbulo hipotalámico; Inf. Rec., Receso infundibular; Med. em., eminencia media; O. ch., quiasma óptico; P.O. nu., núcleo preóptico; P.A., pars anterior; P.I., pars intermedia; P.N., pars nervosa; Port. V., vena portal. (Tomado de Fox, 1983).

La utilización de técnicas histológicas convencionales (Kerr, 1939, 1965; van Oordt, 1963, 1968, 1974; Doerr-Schott, 1968a,b, 1971a) permitió observar la diferenciación de las primeras células cromófilas durante los estadios premetamórficos.

Las técnicas citológicas clásicas no hacen más que detectar, en función de las correspondientes afinidades tintoriales, el almacenamiento de productos hormonales en el citoplasma de las células adenohipofisarias, subsistiendo el problema de la aparición y de la evolución de las actividades funcionales de los diferentes tipos celulares. Este problema ha sido abordado de forma indirecta por técnicas citofisiológicas. En efecto, la atribución de una actividad funcional a un tipo celular dado se basó en la correlación entre su aparición en el lóbulo distal y la entrada en funcionamiento de las glándulas dianas correspondientes (D'Angelo, 1941; Cordier, 1953a,b; van Oordt, 1966; Reyrel, 1970; Zuber-vogeli y Bilhoues-Louis, 1971), o bien en los resultados experimentales relacionados con la función tireotropa en las larvas (Saxen *et al.*, 1957a,b; Saxen, 1958, Kaye, 1961; Pehleman y Hemme, 1972).

Asimismo, los estudios con microscopía electrónica permitieron observar la aparición de los primeros gránulos de secreción que constituían los signos iniciales de diferenciación celular, pero no la identificación precisa de la secreción glandular de las células adenohipofisarias. Los

resultados contradictorios obtenidos con estas técnicas no las hacen recomendables para la identificación de los distintos tipos celulares durante el desarrollo.

El avance metodológico más importante se logró a partir del desarrollo de las técnicas de inmunocitoquímica (Coons *et al.*, 1942) . El uso, en la década de los sesenta, de determinados enzimas (Grahan y Karnovski, 1966) como marcadores para la identificación de la localización de las uniones antígeno-anticuerpo supuso un gran desarrollo de la inmunocitoquímica. Dichas enzimas, al actuar sobre un sustrato definido, dan lugar a la formación de un precipitado local coloreado visible al microscopio.

La posibilidad de reacción cruzada observada por varios investigadores (Emmart *et al.*, 1966; Emmart, 1969; McKeown y van Overbeeke, 1971; Aller, 1970; Billard *et al.*, 1971; Margolis-Kazan y Schreibman, 1981) aumentó las ventajas de estos métodos y demostró simultáneamente la relación inmunológica entre las diferentes hormonas de varios grupos de vertebrados.

Estas técnicas, particularmente sensibles, permiten revelar aún en estadios embrionarios tempranos, los lugares antigénicos que fijan de manera específica los antisueros anti-hormonas hipofisarias. La aplicación de estas técnicas dió un gran impulso al estudio de las células productoras de hormonas hipofisarias de anfibios.

Células de prolactina (PRL).

Con las técnicas histológicas convencionales fueron identificados dos tipos de células acidófilas en la pars distalis de varios anuros (Kerr, 1965; van Oordt, 1974; Doerr-Schott, 1968a,b, 1971a). Ambas son PAS, azul alcian y aldehído fucsina negativas.

Las células acidófilas tipo 1 fueron descritas como células de gran tamaño, poliformes, con núcleo oval situado excéntricamente y que se presentaban aisladas o formando grupos de 2-3 células alrededor de los capilares. Este tipo celular se diferencia antes de la premetamorfosis en la zona caudal de la pars distalis de *Rana temporaria* (Doerr-Schott, 1968a,b), mostrando signos morfológicos de actividad a lo largo del período de crecimiento larvario. Durante la prometamorfosis tardía y clímax metamórfico muestran una clara tendencia a inactivarse, pero tras la metamorfosis vuelven a aumentar en número y tamaño. Estas mismas modificaciones fueron observadas en *Rana pipiens*, *Rana sylvatica* y *Rana palustris* (D'Angelo, 1941); en *Xenopus laevis* (Cordier, 1953a,b; Saxén et al., 1957a,b; Saxén 1958; Kerr, 1966) y en *Bufo bufo* (van Oordt, 1966; Mira-Moser, 1969, 1972).

Las células acidófilas tipo 2 son más pequeñas y alargadas, presentándose en escaso número en la zona dorso-caudal de la pars distalis de adultos (Kerr, 1965; van Oordt,

1974; Doerr-Schott, 1968a,b, 1971a). Su posterior aparición durante el desarrollo con respecto a las del tipo 1, unido a los primeros resultados experimentales que asignaban una función promotora del desarrollo a las células acidófilas, hizo que se considerara a las células tipo 1 como productoras de la hormona del crecimiento (STH) y a las células tipo 2 como las responsables de la secreción de prolactina.

La posterior utilización de técnicas inmunocitoquímicas en la identificación de las células adenohipofisarias hizo que se rechazara esta hipótesis al confirmarse que los anticuerpos anti-PRL de mamíferos se unían de forma específica a las células acidófilas tipo 1 (Mattheij *et al.*, 1971).

Estas técnicas han sido utilizadas en la identificación de tipos celulares adenohipofisarios de anuros adultos y larvales. En renacuajos, los primeros signos de inmunorreacción a los anticuerpos anti-PRL de mamíferos aparecen en el período comprendido entre la eclosión y la primera mitad de la premetamorfosis. Las células de PRL de *Pelobates cultripes* y *Bufo calamita* (García-Navarro *et al.*, 1988a) presentan en los primeros estadios del desarrollo una distribución similar a la observada en *Alytes obstetricans* (Remy y Dubois, 1973; Guyétant *et al.*, 1977) y *Xenopus laevis* (Moriceau-Hay *et al.*, 1979) ocupando la zona rostral de la pars distalis. En el transcurso de la metamorfosis, su zona de localización aumenta hasta extenderse por toda la

glándula al igual que ocurre en *Hyla meridionalis* y *Rana perezi* (García-Navarro *et al.*, 1988a) donde no modifican su patrón de distribución a lo largo del desarrollo larvario. Esta distribución final coincide con la observada en larvas de *Nectophrynoïdes occidentalis* (Zuber-Vogeli y Doerr-Schott, 1984), *Discoglossus pictus* (Gracia-Navarro *et al.*, 1986) así como en adultos de diferentes especies (Doerr-Schott y Dubois, 1973a; Disclos y Remy, 1974; Doerr-Schott, 1974a,b, 1976, 1980; Zuber-Vogeli *et al.*, 1980; Gracia-Navarro y Doerr-Schott, 1982; Zuber-Vogeli, 1983; Campantico *et al.*, 1985a).

Los estudios inmunocitoquímicos demostraron la existencia de células hipofisarias productoras de una sustancia similar a la prolactina de mamíferos cuya significación funcional no estaba definida. No obstante, era comúnmente aceptado que la prolactina de mamíferos retardaba la metamorfosis inducida por la tiroxina (Gona, 1967, 1968) y que la inyección de antisueros anti-PRL ovino (Eddy y Lipner, 1975) y contra una sustancia hipofisaria tipo prolactina aislada en *Rana catesbeiana* (Clemons y Nicoll, 1977a; Yamamoto y Kikuyama, 1982a) aceleraba la metamorfosis. Posteriormente se han aislado en *Rana catesbeiana* (Yamamoto y Kikuyama, 1981) y *Bufo japonicus* (Yamamoto *et al.*, 1986a) unas fracciones proteicas que presentan grandes similitudes con la hormona prolactina de mamíferos y que muestran una actividad promotora de la síntesis de colágeno en la aleta caudal de

renacuajos de *Bufo* cuatro veces más potente que la ejercida por la prolactina ovina. Posteriormente Yamamoto *et al.* (1986b) identificó células de PRL en toda la glándula de *Rana catesbeiana* y más recientemente Guastalla y Campantico (1990) en la zona rostral de la pars distalis de *Rana dalmatina* utilizando anticuerpos anti-Prl de *Rana catesbeiana*. Se ha asumido pues que la sustancia revelada por inmunocitoquímica se corresponde con este factor hipofisario y por tanto, las células que lo producen, pueden ser denominadas propiamente células de prolactina.

Células somatotropas (STH).

Se corresponden con las anteriormente descritas como células acidófilas tipo 2. Son pequeñas, de morfología alargada, con núcleo oval y generalmente se presentan polarizadas hacia capilares. En *Rana temporaria* se localizan en el tercio caudal de la pars distalis (Doerr-Schott, 1968a) presentando, al igual que las de tipo 1, variaciones estacionales en los adultos (van Oordt *et al.*, 1968).

Las primeras células inmunorreactivas a los antisueros anti-STH de mamíferos hacen su aparición al inicio de la premetamorfosis, algo después que las células de prolactina. Su localización es complementaria a la de estas últimas, ocupando la zona caudal de la pars distalis, el tercio posterior en *Alytes obstetricans* (Remy y Dubois, 1973; Guyétant *et al.*, 1977), *Nectophrynoides occidentalis* (Zuber-

Vogeli y Doeer-Schott, 1984) y *Discoglossus pictus* (Gracia-Navarro et al., 1986), y los 2/3 posteriores en *Xenopus laevis* (Moriceau-Hay et al., 1979) y *Rana dalmatina* (Guastalla y Campantico, 1990).

Células tireotropas (TSH).

Las células tireotropas, clasificadas inicialmente como basófilas tipo 1 (van Oordt, 1974) muestran una morfología poligonal con núcleo ovalado; son de pequeño tamaño y se polarizan hacia capilares. Se presentan en escaso número dispersas por la pars distalis aunque muestran una clara tendencia a concentrarse en las regiones dorso-caudal y central en *Rana temporaria* (Doerr-Schott, 1968a) y centro-ventral en *Xenopus laevis* (Kerr, 1965).

Son las primeras células basófilas en aparecer durante el desarrollo larvario (Kerr, 1939, 1966; Doerr-Schott, 1968a,b) siendo muy abundantes a lo largo del clímax metamórfico. D'Angelo (1941) y van Oordt (1966) señalaron la estrecha relación existente entre el desarrollo y la actividad de estas células y la glándula tiroidea.

A pesar de su presumible importante papel en el desarrollo y en el control de la actividad del animal adulto, las células tireotropas han sido las menos estudiadas con técnicas inmunocitoquímicas. Utilizando antisuero anti-TSH ovino (a menudo saturado con LH ovina o bovina para eliminar la subunidad α común), este tipo celular sólo ha sido

identificado en adultos de *Xenopus laevis* (Doerr-Schott y Dubois, 1972c, 1973a), *Rana temporaria* (Doerr-Schott 1974a) y *Rana ridibunda* (Malagón, 1986) en los cuales presenta las mismas características morfológicas y distribución anatómica que las descritas anteriormente con técnicas convencionales de tinción.

En *Xenopus laevis* (Moriceau-Hay et al., 1982), *Discoglossus pictus* (Gracia-Navarro et al., 1986) y *Bufo calamita* (García-Navarro et al., 1988b) se han identificado células tireotropas durante el desarrollo larvario, observándose al inicio de la premetamorfosis, 2-3 células inmunorreactivas al anticuerpo anti TSH en la zona central de la pars distalis. En *Rana perezi*, su primera localización es dorso-medial emigrando hacia posiciones más ventrales a lo largo del desarrollo (García-Navarro et al., 1988b). En el transcurso del período de crecimiento larvario y de la metamorfosis su localización pasa a ser la definitiva del animal adulto.

Células corticotropas (ACTH).

Clásicamente se las han considerado como basófilas tipo 3, PAS positivas y azul alcian negativas. Su morfología es alargada o redondeada con núcleo ovoide en posición más o menos central con una delgada capa citoplasmática que las circunda. Se localizan polarizadas hacia capilares en la zona medio-rostral o rostro-ventral de la pars distalis.

La aplicación inmunocitoquímica de anticuerpos contra polipéptidos sintéticos (ACTH 1-24 y ACTH 17-39) permitió identificar un tipo celular muy inmunorreactivo localizado en la región rostral de la pars distalis de adultos de *Rana esculenta* (Doerr-Schott, 1972; Vaudry et al., 1972, 1977; Dupont y Vaudry, 1974); *Rana temporaria*, *Bufo bufo* y *Xenopus laevis* (Doerr-Scott y Dubois, 1972a,b, 1973a,b); *Nectophrynoides occidentalis* (Zuber-Vogeli et al., 1975); *Rana ridibunda* (Gracia-Navarro y Doerr-Schott, 1982); *Hyla arborea* (Campantico et al., 1985b) y *Rana dalmatina* (Guastalla y Campantico, 1990).

En el caso de los animales en desarrollo, la especie más precoz en cuanto a la diferenciación de las células ACTH es *Xenopus laevis*. En efecto aparecen durante la eclosión como células alargadas que se localizan en la zona rostro-dorsal de la pars distalis (Moriceau-Hay et al., 1982). En *Alytes obstetricians* (Remy y Dubois, 1974), *Nectophrynoides occidentalis* (Zuber-Vogeli y Doerr Schott, 1984) y *Rana temporaria* (Doerr-Schott y Dubois, 1973b), las células inmunorreactivas al anticuerpo anti-ACTH se diferencian al comienzo de la premetamorfosis presentando en las dos primeras especies una localización igual a la observada en *Xenopus laevis*, mientras que en *Rana temporaria* se encuentran distribuidas por toda la pars distalis. En el curso de la prometamorfosis y clímax aumentan en número y su distribución es similar a la observada en los animales adultos.

Algunos investigadores observaron que, tras interrenalectomía (Doerr-Schott, 1972; Dupont y Vaudry, 1974; Vaudry *et al.*, 1977) o inyección de metopirona, se produce un descenso en el número de células de la pars distalis inmunorreactivas a los anticuerpos anti-ACTH que, a los 10-15 días de tratamiento, provoca la desaparición casi total de la inmunorreacción. Estas investigaciones, en animales en condiciones control y experimentales, establecen la existencia de un tipo celular de la pars distalis, identificable inmucitoquímicamente, del que depende la producción de corticotropina y que ha sido denominado como células corticotropas o ACTH.

La intensa inmunorreacción con los anticuerpos anti-ACTH observada en las células de la pars intermedia tanto en adultos como en larvas ha sido objeto de múltiples estudios encaminados a determinar sus causas así como las relaciones existentes entre la hormona ACTH y la MSH. Los resultados de estas investigaciones relacionan la inmunorreacción de estas células de la pars intermedia con la existencia de una sustancia de alto peso molecular que presenta propiedades de una pro-opio-cortico-melanotropina considerada como el precursor común de la hormonas ACTH, MSH, LPH y β -endorfina (Loh y Gainer, 1977, 1979; Pezalla *et al.*, 1978; Loh, 1979, 1981).

1.3. Tiroides.

Es posible definir a las glándulas tiroideas en forma sencilla, como a un tejido que sólo presente en vertebrados es capaz de acumular iodo en grandes concentraciones y convertirlo en el compuesto orgánico tiroxina.

Definida de esta manera, la tiroides aparece como una glándula muy simple, si la comparamos con la hipófisis o la glándula adrenal las cuales producen varias hormonas. Sin embargo, la aparente simplicidad de esta glándula desaparece cuando se la estudia en profundidad.

La tiroides de todos los vertebrados se desarrolla a partir del piso de la faringe. Aparece tempranamente en el desarrollo como un pequeño bolsillo de tejido o una masa compacta que crece ventralmente al nivel del primer o segundo par de bolsas viscerales.

Las tiroides son los únicos órganos alveolares endócrinos de los vertebrados. Sus folículos están formados por un epitelio simple y el lumen de cada folículo contiene coloide. El coloide representa el sitio de almacenamiento de las hormonas tiroideas; por esta razón se considera que es la única glándula capaz de almacenar extracelularmente la hormona.

Los cambios morfológicos que ocurren durante la metamorfosis están estrechamente vinculados con los cambios

funcionales en la actividad celular requeridos para la vida terrestre.

El desarrollo morfológico de la larva es regulado en primer nivel por hormonas. No obstante los órganos endócrinos necesitan crecer y diferenciarse para funcionar adecuadamente durante la metamorfosis. En particular las tiroides deben sintetizar y liberar sus hormonas tempranamente en el desarrollo larval, para que la prometamorfosis pueda ser iniciada.

Las glándulas tiroides en anfibios son pares y en general de similar aspecto a las de otros vertebrados. Observadas al microscopio óptico constan de folículos con coloide rodeadas por tejido conectivo. En *Xenopus laevis* se observan incipientes folículos en el estadio 48-49 (Nieuwkoop y Faber, 1975) y en el estadio 50 se encuentran de 13 a 16 folículos por lóbulo (ver Fox, 1983). Durante el desarrollo de larvas anuras, las tiroides crecen firmemente en conjunto. En *Rana temporaria* entre los estadios 41 al 53 (Cambar y Marrot, 1954) las mediciones de la población nuclear tiroidea y el volúmen tisular se incrementan cerca de 50 veces, el volumen general de la glándula cerca de 60 veces y el volúmen del coloide 300 veces. El volumen celular individual es cerca de 700-800 μm^3 y al final del clímax, cuando la glándula se ha reducido considerablemente, 400 μm^3 . Las tiroides de *Bombina bombina*, *Bombina variegata*, *Pelobates fuscus*, *Hyla arborea*, y *Rana temporaria* fueron investigadas cualitativa y

cuantitativamente durante el desarrollo larval, observándose que la máxima actividad en términos de volumen, superficie secretora, area de folículos y coloide vacuolado, coincide con el período de emergencia de los miembros anteriores (ver Fox, 1983). El análisis estructural clásico muestra generalmente un elevado incremento de actividad cerca del clímax, llegando a niveles nunca hallados en otros estados de vida de los anfibios (Coleman et al., 1968). El coloide folicular que es almacenado como prohormona, tiroglobulinas, se incrementa al máximo durante la prometamorfosis y decrece en el clímax, dejando al final de la metamorfosis los folículos vacíos, colapsados, demostrando la terminación del período de fuerte síntesis y secreción hormonal (ver Rosenkilde y Using, 1990).

La ultraestructura de las tiroides de larvas de *Xenopus laevis* durante el desarrollo ha sido descrita por Coleman et al. (1968). Durante la premetamorfosis se observan células foliculares epiteliales cúbicas, incrementándose su altura hasta la mitad del clímax, donde se visualizan con forma cilíndrica o columnar. Las bien desarrolladas células tiroideas de larvas de *Xenopus* prometamórficas, en general son muy similares a las encontradas en *Rana* o en otros vertebrados. Observándose un gran incremento de algunas organelas, especialmente del retículo endoplásmico rugoso (RER) y del complejo de Golgi. Cambios presumiblemente concernientes con la síntesis y secreción de las hormonas

tiroideas (Regard, 1978). También las vacuolas intracelulares con coloide son visualizadas al igual que numerosos y densos lisosomas. Hacia el final del clímax ocurre un progresivo decrecimiento en la altura celular hasta el final de la metamorfosis, donde se observan células virtualmente escamosas.

Cabe destacar que ocasionalmente se han observado células "parafoliculares" en las tiroides de *Xenopus laevis* durante la metamorfosis, pero su número no estaría relacionado con el estadio metamórfico (Coleman *et al.*, 1968), su rol es aún incierto.

En la *figura 2*, se esquematizan los principales cambios en la ultraestructura de las células foliculares tiroideas durante el ciclo metamórfico de *Rana Japonica*.

Actividad biosintética.

Durante la metamorfosis de anuros hay un paralelismo entre la actividad endócrina tiroidea y su ultraestructura, reflejada en un gran desarrollo del RER y de la síntesis de tiroglobulinas que llega a un máximo en el clímax. Durante este período la variación en la actividad peroxidasa, responsable por la oxidación del yoduro, conduce a la incorporación de yoduro en las tiroglobulinas del coloide. La distribución de las peroxidasas en las células foliculares se incrementa durante la metamorfosis, y su actividad es reconocida en el RER, Golgi y en pequeñas vesículas apicales.

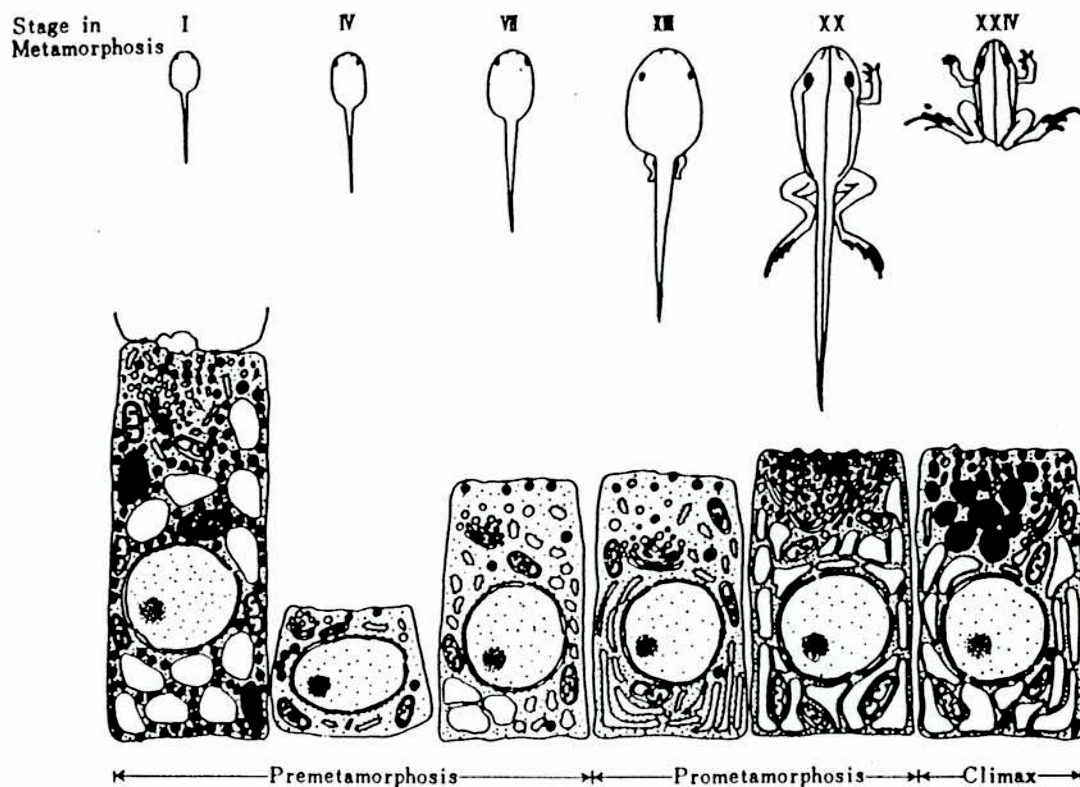


Fig. 2 Esquema general de los principales cambios en la ultraestructura de las células foliculares tiroideas durante el ciclo metamórfico de *Rana japonica*. Premetamorfosis (estadios I-XI) es un periodo de diferenciación de las células tiroideas. Prometamorfosis (estadios XII-XIX) es un periodo de síntesis y almacenamiento de hormonas tiroideas en el lúmen folicular con un gradual incremento en la liberación. Clímax (estadios XX-XV) es un periodo de máxima secreción y liberación de hormonas tiroideas. Estadios según Taylor y Kollros, (1946). (Tomado de Fox, 1983).

Después de la metamorfosis la actividad peroxidasa en las células tiroideas es reducida y sólo se reconoce en algunas formaciones del RER.

La tasa de incorporación de iodo radioactivo por las tiroides de anuros es baja durante la premetamorfosis, pero se incrementa a un máximo cerca del principio del clímax. La biosíntesis de tiroglobulina también se incrementa en la prometamorfosis. La química de la tiroglobulina anfibia no es conocida exactamente, pero inmunológicamente no está relacionada con la tiroglobulina de mamíferos, difiriendo de esta en algunas propiedades químicas y fisicoquímicas (Dodd y Dodd, 1976). La tiroglobulina de *Xenopus* difiere de otras formas en su alto contenido de T₄. Monoiodotirosina (MIT) y diiodotirosina (DIT) son sintetizadas antes que la tiroxina en larvas anuras. El comienzo de la biosíntesis de las hormonas tiroideas en relación con el grado de morfogénesis de la glándula ocurriría muy temprano en las larvas de *Bufo japonicus* y *Xenopus laevis*, ya que se han encontrado muy pequeñas pero significativas cantidades de iodotironinas en épocas en que la tiroides no ha completado su desarrollo (ver Fox, 1983). Sin embargo los niveles de todos los compuestos iodados tiroideos presentes en embriones antes de que se desarrolle la tiroides y sea completamente funcional son infinitesimales si se comparan con las concentraciones halladas en el clímax metamórfico.

Tiroglobulinas marcadas aparecen en apreciable cantidad durante la premetamorfosis, cuando los folículos de la glándula comienzan a desarrollarse. En estos estadios la principal iodotirosina es el MIT y la principal iodotironina es la T₃. Luego predominan el DIT y la T₄. Una gran proporción de las hormonas tiroideas (T₃ y T₄) sin embargo siempre están presentes cerca y durante el clímax (Regard, 1978).

Un activo sistema de transporte en las tiroides concentra yoduro del plasma el cual es oxidado por peroxidasas. Los residuos tirosina en las tiroglobulinas (glicoproteínas) son iodados a la forma MIT y DIT. Dos moléculas de DIT o una de MIT más una de DIT, se unen para formar T₄ o T₃ respectivamente.

La T₃ y T₄ son liberadas de la tiroglobulina por proteólisis y difunden a la sangre donde se unen reversiblemente a la alfa-globulina y prealbúmina, las principales proteínas plasmáticas de transporte para hormonas tiroideas. Probablemente pequeñas cantidades de T₃ libre y T₄ son metabólicamente activas, sus niveles dependen de las concentraciones de proteínas transportadoras y de la tasa de utilización de los tejidos blanco (avidad tisular). Algunas fracciones de MIT y DIT se liberan al mismo tiempo que la T₃ y T₄, son deiodadas por enzimas localizadas en los microsomas de las células tiroideas. La actividad biosintética del tejido tiroideo se describe en la *figura 3*.

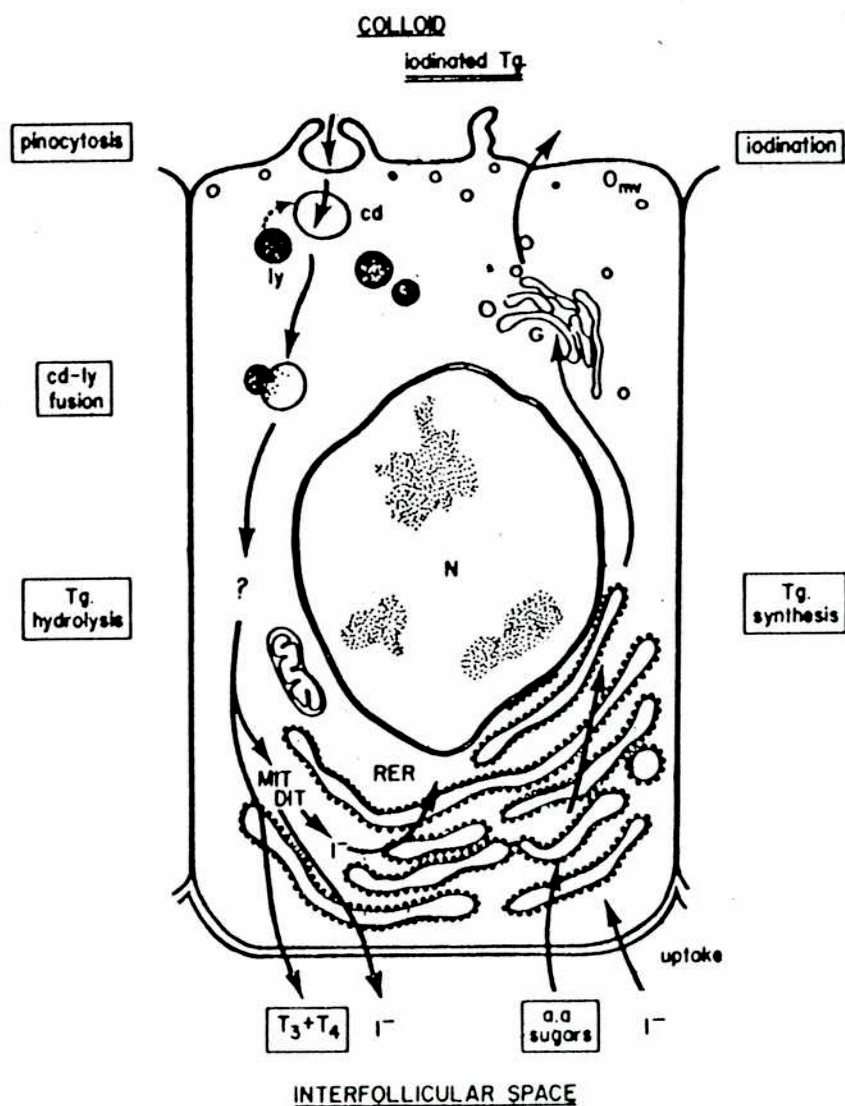


Fig. 3 Reacciones específicas del tejido tiroideo anuro. aa., aminoácido; cd., vacuolas coloide; G., Complejo de Golgi; I⁻, ioduro; ly., lisosoma; mv., microvesículas; N., nucleo; RER., retículo endoplásmico rugoso; Tg., tiroglobulina; MIT., monoiodotirosina; DIT., diiodotirosina; T₃, triiodotironina; T₄, tiroxina. (Tomado de Fox, 1983).

Hormonas tiroideas en sangre.

Mediciones de hormonas tiroideas (TH) por radioinmunoensayo en sangre muestran practicamente la misma situación que lo observado estructural y ultraestructuralmente. El contenido de tiroxina (T₄) plasmática es bajo durante la premetamorfosis. El incremento comienza antes de la emergencia de los miembros anteriores en *Rana catesbeiana* (Regard *et al.*, 1978; Mondou y Kaltenbach, 1979; Suzuki y Suzuki, 1981) haciéndose máxima al llegar al clímax metamórfico (valores cercanos a 13 nM) y disminuyendo al final del mismo.

El aumento de T₄ en *Xenopus laevis* (Leloup y Buscaglia, 1977; Buscaglia *et al.*, 1985) aparentemente comienza más temprano que en *Rana catesbeiana*. Sin embargo una comparación del desarrollo anatómico entre estas dos especies anuras no tan relacionadas puede ser sólo aproximada.

Las mediciones de T₃ en *Xenopus laevis* (Leloup y Buscaglia, 1977) y *Rana catesbeiana* (Suzuki y Suzuki, 1981) muestran un incremento levemente retrasado con respecto al de T₄, siendo las concentraciones encontradas menores (valores máximos cercanos a 7 nM). Si bien la T₃ es la que realiza la mayor parte de la actividad hormonal, debido a la elevada afinidad de unión al receptor.

Efecto en los tejidos.

Ha sido señalado y no siempre reconocido que no solo deberán verificarse concentraciones elevadas de hormona secretada sino también que los tejidos blancos deberán estar sensibles a las HT. Deben poseer receptores nucleares donde se unirá la HT libre y todo el aparato celular para responder al mensaje recibido por la señal hormonal. Dos tipos de receptores ($TR\alpha$ y $TR\beta$) han sido descriptos en anfibios y su secuencia de aminoácidos sería similar a la señalada para aves o mamíferos (Baker y Tata, 1990). Pequeñas cantidades de receptores han sido encontradas en tejidos de larvas muy poco desarrolladas; este hecho podría explicar la temprana competencia de estos tejidos por las hormonas. Estos receptores existen en la mayoría de los diferentes tipos celulares larvales (células sanguíneas, hepatocitos, células de la cola o de los miembros), pudiendo unir tanto T_3 como T_4 .

La maduración tisular es producida por bajas concentraciones de las mismas hormonas tiroideas. Un notable ejemplo es la maduración y activación de las células hipotalámicas productoras de hormona liberadora de tirotrofina (TRH). Este hecho llamó la atención de Goos, quien demostró la diferenciación celular de la pars magnocellularis del núcleo preóptico en larvas de *Xenopus laevis* (Goos 1968, 1969, Goos et al., 1968a,b). Estas células podrían ser o no células TRH, pero seguramente son neuronas

que conectan la neurohipófisis. Lo importante fue el demostrar que el desarrollo de las células TRH es parte del desarrollo general estructural y funcional del cerebro.

Otra demostración de la importancia del potencial inherente de las células diana, es que una misma hormona en un mismo organismo causa cambios tan variados como 1) desaparición de tejidos, 2) crecimiento y diferenciación de tejidos, y 3) cambios en el potencial sintético de otros tejidos. La base de tan variadas respuestas en células con los mismos genes debe yacer en la historia ontogenética de los tejidos en cuestión, la influencia de las células circundantes y de parte del ovoplasma donde las células de los tejidos se originaron.

Ha sido también demostrado que de las dos formas moleculares de las HT la triiodotironina es 5 veces más potente que la tiroxina. Se ha comprobado que la afinidad de unión de la T₃ al receptor es 20 veces mayor que la T₄, y esta diferencia se refleja en las concentraciones necesarias para producir efectos en experimentos de corta duración. La inducción de la metamorfosis en axolotes por inmersión en solución de HT, demostró que las dos moléculas producen los mismos efectos en experimentos de larga duración pero que los cambios producidos por la T₄ ocurren 3-4 días después que con la T₃ (Prahlad y Delanney, 1965). Esto puede explicarse por la capacidad de desiodinizarse de la T₄ en T₃. Esta

maduración pudo inducirse en larvas premetamórficas de *Rana catesbeiana* por tratamiento con T₄ (Galton *et al.*, 1982).

Acción de sustancias goitrógenas.

El desarrollo larval se produce con concentraciones de HT que se incrementan en el curso del desarrollo pero que continúan siendo bajas si se comparan con los valores climáticos, pero posiblemente no muy bajos si se comparan con los de los adultos. Sin embargo el desarrollo de algunas estructuras celulares, incluida su actividad bioquímica de síntesis, después del comienzo de la premetamorfosis es prácticamente independiente de las HT, como se ha demostrado en larvas hipofisectomizadas, tiroidectomizadas o mantenidas bajo la acción de drogas antitiroideas.

Las drogas antitiroideas bloquean la síntesis de hormonas tiroideas conduciendo a la formación de "goitros" (bocio) en la glándula tiroides por respuesta al incremento de secreción de TSH. Debido a esta acción reciben también la denominación de ***sustancias goitrógenas.***

Las sustancias goitrógenas han sido clasificadas en dos grupos de acuerdo a si inhiben el transporte del yoduro o si inhiben la transformación del yoduro a yodo orgánico y el acople de yodotirosinas. En el primer grupo encontramos a los aniones monovalentes, dentro de los cuales los tiocianatos y los percloratos son los más activos. Su acción puede ser revertida suministrando altas dosis de yoduro. El segundo

grupo incluye varios compuestos caracterizados por la presencia de un grupo tionamida dentro de la molécula, siendo los más activos el propiltiouracilo, la tiourea, etc. Su acción no puede revertirse aún en presencia de grandes cantidades de yoduro.

El yodo radioactivo puede considerarse también un goitrógeno puesto que suministrado en exceso en larvas anuras ha alterado la funcionalidad de la glándula tiroidea (Guastalla *et al* 1972; Guastalla y Campantico, 1974, 1979).

Diferentes sustancias goitrógenas como ser el propiltiouracilo (Maclean y Turner, 1976), el perclorato de potasio (Dainton, 1988) o la tiourea (Yamashita *et al*, 1990) han sido utilizados para detener el desarrollo metamórfico en larvas anfibias durante meses.

El volumen de la glándula tiroidea es generalmente inversamente proporcional a la concentración de tiroxina plasmática de la larva (Fox, 1983). La inmersión de larvas anfibias en goitrógenos como la tiourea, propiltiouracilo, provoca la inhibición de la secreción de hormonas tiroideas, presentando grandes tiroideas hiperplásicas con extensos folículos llenos de coloide compacto (Guardabassi *et al.*, 1964; Goos, 1978; Rosenkilde, 1979; Yamashita *et al.*, 1990).

En larvas tratadas con propiltiouracilo o toiurea durante pocas semanas se observó, degranulación e hipertrofia de las células TSH (Goos, 1978; Rosenkilde, 1979, Kurabuchi *et al.*, 1992), y degranulación e hiperactividad de la parte dorsal magnocelular del núcleo preóptico (centro productor de TRH) (Mimnagh *et al.*, 1987). Se comprobó también que el suministro de T₄ exógena provocaba efectos opuestos (Goos, 1968b).

Todos estos resultados en larvas anfibias han sido interpretados en términos de mecanismos regulatorios del tipo "feedback", involucrando los mínimos niveles de hormonas tiroideas en circulación y la elevada estimulación del eje hipotálamo-hipófisis sobre la glándula tiroides.

1.4. Hormonas adenohipofisarias y el control endócrino de la metamorfosis de anfibios.

El fenómeno del desarrollo y la metamorfosis ha fascinado de igual modo a biólogos y naturalistas durante siglos. Los estudios sistemáticos realizados por fisiólogos, bioquímicos y endocrinólogos han aportado una gran cantidad de información sobre los distintos aspectos de la biología de Vertebrados relacionados con el crecimiento y los cambios metamórficos.

Durante la primera mitad del siglo XX se realizaron numerosos estudios encaminados a establecer la relación

existente entre las distintas glándulas endócrinas y la metamorfosis.

Fue Gudernatsch (1912) quien inició el estudio de la regulación endócrina de la metamorfosis al proponer que el mediador último de la mayoría de los cambios que ocurren es la glándula tiroidea, órgano responsable de la síntesis y liberación de dos hormonas: Tiroxina (T_4) y Triyodotironina (T_3). En esa misma década se estableció la función estimuladora ejercida por la pars distalis hipofisaria vía TSH (hormona tireotropa o tirotrofina) sobre la secreción de las hormonas tiroideas (TH). Sucesivamente, se observó la función promotora del desarrollo y antimetamórfica de otra hormona hipofisaria (la prolactina) así como la acción estimuladora o inhibidora del hipotálamo sobre la síntesis y secreción de las hormonas hipofisarias. Se concluyó que el control endócrino de la metamorfosis dependía del antagonismo existente entre las hormonas tiroideas y la prolactina, las primeras inducirían los cambios metamórficos mientras la prolactina inhibiría algunas acciones de las hormonas tiroideas y estimularía el crecimiento de ciertas estructuras larvarias como la cola y branquias (Nicoll, 1974; Bern, 1975, 1983; Dodd y Dodd, 1976; Norris, 1983). Posteriormente se ha observado la implicación de otras hormonas hipofisarias como la corticotropina (ACTH), así como de otras glándulas endócrinas como las interrenales, la pineal, etc. De todo ello cabe concluir que las hormonas adenohipofisarias juegan un importante papel en el control de la metamorfosis.

Las hormonas adenohipofisarias han sido divididas en tres familias de moléculas homólogas, postulándose la existencia de una molécula ancestral única para cada familia. La evolución de dichas hormonas ha consistido en el aumento del número de moléculas de cada familia, gracias a la duplicación del gen ancestral único seguido por mutaciones, bien en la nueva copia del gen, bien en el gen primitivo (Fontaine, 1984). No obstante, la aparición de una nueva molécula no implicaría la aparición inmediata de nuevas funcionalidades específicas, este proceso sería más lento realizándose por evolución ulterior de los receptores (la hormona aparece antes de que existan órganos diana específicos). Las similitudes estructurales, que implican un ancestro molecular común, son la causa de los solapamientos funcionales existentes entre las moléculas de una misma familia.

Tirotrofina (TSH).

La hormona tireotropa o tirotrofina pertenece junto a las hormonas gonadotropas a la denominada familia I. Son glicoproteínas constituidas por dos subunidades. α y β ; de las cuales la subunidad α es, dentro de una especie, idéntica en todas las hormonas de esta familia, siendo la subunidad β la que confiere las características funcionales específicas (Gorbman *et al.*, 1983; Norris, 1985).

La TSH tiene como órgano diana las glándulas tiroides estimulándola en todas las fases de su funcionalidad, desde

la captación de iodo por las células foliculares hasta la liberación de las hormonas tiroideas. Esta estimulación tiroidea ejercida por la TSH la hace responsable indirecta de los cambios que ocurren durante la metamorfosis que han sido relacionados con un antagonismo hormonas tiroideas-prolactina. Pese a su importancia y en parte debido a su difícil aislamiento y caracterización, no se han realizado mediciones directas de las variaciones que podrían presentar sus niveles plasmáticos o hipofisarios durante el desarrollo de anfibios. La mayoría de los datos obtenidos son indirectos y se basan principalmente en los niveles de hormonas tiroideas medidos con RIA, iodo ligado a proteínas (PBI) o tasa de captación de I^{131} por los folículos tiroideos (Kaye, 1961; Just, 1972; Leloup y Buscaglia, 1977; Miyauchi *et al.*, 1977; Regard *et al.*, 1978; Mondou y Kaltenbach, 1979; Suzuki, 1981; Weil, 1986). Los resultados obtenidos indican una liberación masiva de hormonas tiroideas durante el clímax metamórfico, que sería la respuesta a una liberación anterior de TSH por la hipófisis.

Pehlemann (1974) realizó un meticuloso análisis a nivel ultraestructural del sistema tiroideo en *Xenopus*. Identificó granulos de secreción en las células TSH y describió estadios en su morfología correspondiendo a la síntesis y secreción de la hormona. También observó que la distribución de los estadios funcionales en los gránulos secretorios reflejaban

el desarrollo de la capacidad sintética y secretora de las células tireotrópicas.

El único estudio que hace referencia a medidas de TSH en hipófisis es un bioensayo indirecto ideado por Dodd y Dodd (1976) con el que se observó que los niveles de TSH hipofisaria presentaban una distribución bimodal a lo largo del desarrollo observándose dos niveles máximos, uno a comienzos del climáx y otro a mediados del mismo.

La hormona tireotropa está bajo regulación hipotalámica vía TRH a la vez que en adultos se ha observado la existencia de un "feedback" negativo de las hormonas tiroideas (Jacobs y Kuhn, 1992). En este sentido se ha observado que la inyección de TRH provoca la elevación de los niveles circulantes de T₄ en adultos (Rosenkilde, 1979; Darrás y Kühn, 1982) y la inducción de cambios metamórficos en renacuajos (Etkin y Kim, 1971; Shiomi *et al.*, 1972). Asimismo, se ha postulado un aumento en la síntesis y liberación de TSH, PRL y GH tras la administración de bajas dosis de TRH (Malagón *et al.*, 1986; Gracia-Navarro *et al.*, 1990). Sin embargo en larvas las observaciones son contradictorias ya que recientemente algunos estudios revelarían que otro factor hipotalámico, la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), y no la TRH estimularía a las células tireotropas (Denver y Licht, 1989; Gancedo *et al.*, 1992).

Prolactina (PRL) y somatotropina (STH).

La prolactina y la somatotropina u hormona del crecimiento (GH) pertenecen a la segunda familia de hormonas hipofisarias. Son proteínas constituidas por unos 200 aminoácidos que presentan un alto grado de similitud estructural. La funcionalidad principal de la STH como promotora del crecimiento no ha variado a lo largo de la evolución aunque esta función pueda ser ejercida por mecanismos diferentes; sin embargo la prolactina presenta una gran variedad de funciones relacionadas con la reproducción, osmorregulación, crecimiento larvario, etc.

En este sentido, la prolactina ha sido considerada como la hormona promotora del crecimiento durante los estadios larvarios en anfibios (Kikuyama *et al.*, 1980) mientras la somatotropina estimularía el crecimiento de los ejemplares postmetamórficos (Brown y Frye, 1969; Zipser *et al.*, 1969; Snyder y Frye, 1972, 1974; Kikuyama *et al.*, 1984). En este sentido, se ha observado que el suministro de STH a adultos (Frye *et al.*, 1972; Snyder y Frye, 1972, 1974) produce un aumento de la síntesis de proteínas que no se observa cuando se suministra PRL. En lo que concierne al crecimiento larvario, los resultados son contradictorios, observándose que la prolactina es más eficaz como estimuladora del crecimiento (expresado en términos de tamaño y peso corporal) que la hormona somatotropa (STH) en algunas especies (Berman *et al.*, 1964; Bern *et al.*, 1967; Etkin y Gona, 1967; Gona,

1967; Campantico *et al.*, 1968; Frye *et al.*, 1972; Snyder y Frye, 1972, 1974) mientras en otras especies se invierte la situación (Remy y Bounhiol, 1965; Enemar *et al.*, 1968; Enemar, 1978) mostrando la STH una mayor capacidad de producir crecimiento que la PRL. Estos resultados parecen indicar que existe una especificidad de especie en la respuesta a la PRL y STH como hormonas promotoras del crecimiento (Dodd y Dodd, 1976). Este cambio producido en la respuesta puede ser debida a la pérdida de sensibilidad a la PRL por parte de estructuras exclusivamente larvarias como la cola y branquias (Nicoll, 1974).

Aunque los datos contradictorios obtenidos no permiten generalizar sobre el posible papel somatotrópico de la prolactina, existen evidencias consistentes sobre el papel antimetamórfico de esta hormona. Los resultados obtenidos con métodos que reducen los niveles de PRL circulante, tales como la inyección de anti-PRL ovino (Eddy y Lipner, 1975) y anti PRL de *Rana catesbeiana* (Clemons y Nicoll, 1977a; Yamamoto y Kikuyama, 1982a) o de inhibidores de la secreción de prolactina (Platt, 1976; Seki y Kikuyama, 1979, 1982), muestran una sobreestimulación de la metamorfosis inducida por T₄. Asimismo se ha observado que la inyección de anti-STH de *Rana catesbeiana* a larvas de la misma especie (Clemons y Nicoll, 1977a) no afectaba a los cambios metamórficos, indicando que la acción antimetamórfica es más específica de la PRL que los efectos promotores del crecimiento (White y Nicoll, 1981).

La acción antimetamórfica ha sido atribuida a un antagonismo entre la prolactina y la tiroxina mediante una acción goitrogénica directa (Campantico *et al.*, 1968) y/o a una competencia entre ambas hormonas en los tejidos periféricos larvarios (Etkin y Gona, 1974; Nicoll, 1974; Dodd y Dodd, 1976). En este sentido se ha observado que la PRL inhibe la regresión de la cola inducida por T₄ (Eddy y Lipner, 1975; Yamamoto y Kikuyama, 1982a) pero no afecta al acortamiento del tracto alimenticio ni al desarrollo de los miembros pelvianos y la eminencia media en las larvas.

Aunque se ha aislado (Clemons y Nicoll, 1977b) y caracterizado en la hipófisis de *Rana catesbeiana* (Yamamoto y Kikuyama, 1981) y de *Bufo japonicus* (Yamamoto *et al.*, 1986a) una hormona antimetamórfica, promotora del crecimiento y semejante a la prolactina, existen pocos datos sobre los niveles circulantes e hipofisarios de PRL durante el desarrollo de anfibios. Las medidas realizadas con RIA homólogo en *Rana catesbeiana* (Clemons y Nicoll, 1977b; Yamamoto y Kikuyama, 1982b) señalan un gran aumento de los niveles plasmáticos de PRL durante el clímax, habiéndose asimismo detectado una alta actividad biosintética en la hipófisis durante el mismo período (Yamamoto *et al.*, 1986b). Los mismos resultados se observaron para *Bufo Japonicus* (Niinuma *et al.*, 1991).

Corticotropina o ACTH.

La mayoría de los datos existentes sobre la implicación de la hormona corticotropa (ACTH) en la regulación de la metamorfosis son indirectos, basándose en la acción de las hormonas interrenales. La inyección de ACTH en larvas de *Xenopus laevis* (Hanke y Leist, 1971; Hanke y Neumann, 1972; Gunesch, 1974; Neubrand y Hanke, 1974) provoca los mismos cambios en el metabolismo lipídico, protéico y de carbohidratos que las inyecciones de cortisol y corticosterona, posiblemente por la estimulación de la secreción de estas hormonas por parte de las glándulas interrenales. Así mismo, la inyección de corticoides no provoca la reabsorción de la cola, pero origina una aceleración de este proceso en larvas a las que se les ha inducido la metamorfosis con hormonas tiroideas. Lo que hizo deducir una acción sinérgica entre dichas hormonas y los corticoides (Krug *et al.*, 1980, 1983; Kikuyama *et al.*, 1981, 1983; Suzuki y Kikuyama, 1981, 1983; Yu *et al.*, 1985).

Los datos obtenidos por RIA muestran bajos niveles de hormonas interrenales (corticosterona y aldosterona) en los primeros estadios del desarrollo que se incrementan durante la prometamorfosis para alcanzar sus valores máximos en el climax (Krug *et al.*, 1978, 1983; Jaffe, 1981; Suzuki y Kikuyama, 1981; Leloup-Hatey *et al.*, 1990). La elevación de los niveles de corticoides durante la metamorfosis es muy similar a la observada en las hormonas tiroideas (Leloup y

Buscaglia, 1977; Miyauchi *et al.*, 1977; Regard *et al.*, 1978; Mondou y Kaltenbach, 1979; Suzuki y Suzuki, 1981; Weil, 1986). El suministro de inhibidores de la síntesis de corticosteroides (Kikuyama *et al.*, 1981) produce un retraso en la metamorfosis espontánea o inducida por T₄. Recientemente, en las hipófisis de larvas de *Rana catesbeiana*, Yu *et al.* (1985) han detectado la existencia de una sustancia, tipo ACTH, que tras unos valores iniciales muy bajos muestra un gran incremento en sus valores circulantes durante el clímax.

La evolución de la metamorfosis dependería de un adecuado equilibrio entre corticosterona y hormonas tiroideas. Durante la prometamorfosis un exceso de corticosterona puede determinar una específica inhibición de la metamorfosis como consecuencia de las bajas concentraciones de hormonas tiroideas circulantes. Durante el clímax, las hormonas tiroideas inducirían la estimulación de las glándulas interrenales las cuales liberarían grandes cantidades de corticosterona y aldosterona necesarias para completar la metamorfosis (ver Leloup-Hatey *et al.*, 1990).

Teoría de Etkin.

En la década de los 60, Etkin (1964,1968) en base a resultados propios y de otros autores, propuso el modelo más completo existente hasta entonces sobre el mecanismo

endócrino de regulación de la metamorfosis de anuros, cuyos supuestos fundamentales son los siguientes:

Durante la premetamorfosis, período caracterizado por un gran crecimiento larvario pero escaso desarrollo de los miembros, la eminencia media y el hipotálamo están muy poco desarrollados, no existiendo un control activo por parte de este último sobre las funciones hipofisarias. Por lo tanto, la síntesis y secreción de prolactina, bajo control inhibitorio en adultos (Seki y Kikuyama, 1982; Gorbman *et al.*, 1983; Norris, 1985), sería alta en este período. Por su parte, el eje hipófisis-tiroides mantendría un bajo nivel de actividad mostrando las células TSH una alta sensibilidad al "feedback" negativo de las hormonas tiroideas. Por tanto, la secreción de TSH y hormonas tiroideas sería mínima y no interferiría en la actividad de la prolactina, que podría así potenciar el crecimiento larvario.

Durante la prometamorfosis se produciría un lento pero progresivo incremento de la actividad tiroidea reflejado en el aumento sustancial de la cantidad de hormona T₄ almacenada dentro de los folículos en desarrollo, así como por el gran crecimiento de los miembros. Esta activación tiroidea sería el reflejo del aumento en los niveles de TSH debido al desarrollo gradual de las áreas hipofisiotropas hipotalámicas y el aumento consecuente de la influencia hipotalámica sobre la adenohipófisis vía TRH. Los altos niveles de T₄ alcanzados provocarían el desarrollo funcional de la eminencia media y

el establecimiento de las conexiones vasculares del sistema porta hipotálamo-hipofisario que permitirían a la TRH actuar sobre las células adeno-hipofisarias, promoviendo la síntesis y liberación de TSH. El aumento en los niveles de TSH provocaría a su vez un mayor desarrollo de la eminencia media estableciéndose de esta forma un "feedback" positivo. Esta producción progresiva de TRH-->TSH--> TH constituiría un sistema autocatalítico que originaría una respuesta en espiral alcanzándose niveles máximos al comienzo del clímax.

Asimismo, el mencionado desarrollo del hipotálamo y la eminencia media implicaría el establecimiento del control inhibitorio de la secreción de prolactina, cuyos niveles circulantes disminuirían progresivamente, alcanzándose los valores mínimos al final de este período. El antagonismo existente entre la prolactina y las hormonas tiroideas en los tejidos periféricos se reduciría al mínimo permitiendo transformaciones completas y rápidas del ejemplar.

A lo largo del clímax metamórfico, el "feedback" positivo del eje hipotálamo - hipófisis - tiroides desaparece, persistiendo únicamente el "feedback" negativo. Etkin no propuso ningún mecanismo que explicara la pérdida de dicho "feedback" positivo. En la *figura 4*, se esquematiza la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides durante la metamorfosis de anuros y en la *figura 5*, se esquematiza la relación entre el hipotálamo y la hipófisis en larvas de anuros en clímax metamórfico.

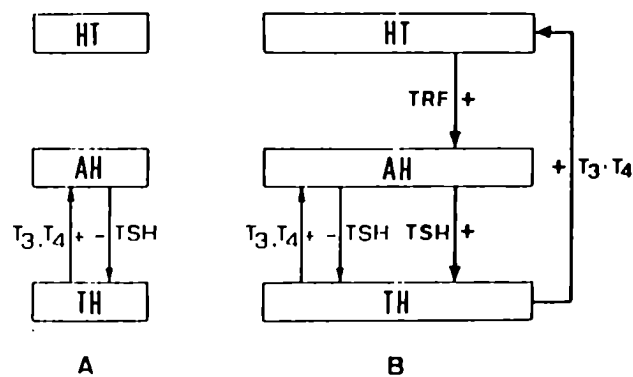


Fig. 4 Actividad del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides durante la metamorfosis de anuros. **A. Larvas premetamórficas.** Un feedback negativo mantiene la actividad tiroidea en un nivel muy bajo. El incremento en el nivel de hormonas tiroideas plasmáticas inhibe la secreción de tirotrófina (TSH) por la adenohipófisis. Consecuentemente la glándula cesa de funcionar. El hipotálamo todavía no controla la actividad de las células TSH. **B. Animales metamórficos.** A través del incremento en la liberación de TRF y TSH, el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, sufre una aceleración en la actividad provocando un fuerte aumento en el nivel de hormonas tiroideas plasmáticas. El feedback negativo descrito en A es enmascarado por el efecto estimulador de este feedback positivo. AH., adenohipófisis; HT., hipotálamo; TH., glándulas tiroides. (Tomado de Etkin, 1968).

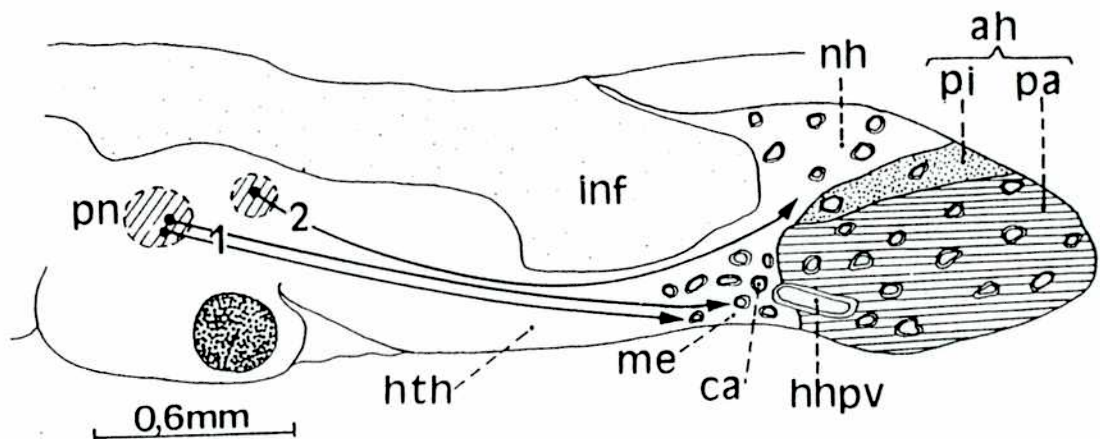


Fig. 5 Relaciones entre el hipotálamo y la hipófisis en anuros (larvas en clímax de *Rana pipiens*). Gránulos de TRF (factor liberador de tirotrofina) son sintetizados en centros neurosecretorios hipotalámicos como el núcleo preóptico (pn), y llegan a la eminencia media (me) por los axones 1. Estos gránulos son liberados en los capilares sanguíneos (ca) que se unen formando un sistema vena-porta entre el hipotálamo y la hipófisis (hthpv). Finalmente, los gránulos TRF estimulan las células tirotróficas localizadas en la pars distalis o anterior (pa) de la adenohipófisis (ah). Los axones 2 llevan productos neurosecretorios hacia la neurohipófisis (nh). hth., hipotálamo; inf., infundíbulo; pi., pars intermedia. (Tomado de Etkin, 1968).

Teoría de Dodd y Dodd.

Las discrepancias existentes entre los postulados de Etkin y los niveles de hormonas tiroideas obtenidos con RIA, PBI y captación de I^{131} (Kaye, 1961; Just, 1972; Leloup y Buscaglia, 1977; Miyauchi *et al.*, 1977; Regard *et al.*, 1978; Mondou y Kaltenbach, 1979; Suzuki y Suzuki, 1981; Weil, 1986) así como sus propios resultados sobre el contenido de TSH en la hipófisis, indujeron a Dodd y Dodd (1976) a postular una teoría alternativa. Estos autores sugirieron que la producción de hormonas tiroideas era relativamente alta durante la prometamorfosis aunque esto no se viera reflejado en un aumento de los niveles plasmáticos como consecuencia de la gran "avidez" mostrada por los tejidos periféricos por estas hormonas. Esta denominada "avidez" tisular aumentaría de forma gradual y continua durante la prometamorfosis de forma que las hormonas serían captadas de la sangre tan pronto como su nivel aumentara ligeramente (Frieden y Just, 1970; Yoshiyato y Frieden, 1975). Hacia el final de este período, la capacidad tisular de captar y utilizar las hormonas tiroideas se saturaría produciéndose un aumento de los niveles circulantes de hormonas tiroideas motivado por la secreción continua de dichas hormonas por parte del tiroides. Por tanto, el especulativo y cambiante "feedback" negativo-positivo-negativo de Etkin no sería necesario existiendo un único "feedback" negativo durante toda la vida larvaria. Según esta teoría el primer control de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides residiría en los mismos tejidos

que están sufriendo la metamorfosis. Las bajas temperaturas actuarían a nivel tisular reduciendo la capacidad de utilización de la tiroxina, lo que daría lugar al gran aumento observado en los niveles circulantes de hormonas tiroideas; de esta forma, se haría disminuir la actividad del eje endócrino hipotálamo-hipófisis-tiroides mediante un "feedback" negativo.

Esta hipótesis explica los mecanismos de control metamórficos de manera más sencilla negando la existencia de niveles de hormonas tiroideas más altos y en aumento durante la metamorfosis en comparación con los estadios premetamórficos (Fox, 1983). No obstante, la inexistencia de datos que apoyen la supuesta "avidez" a las TH por parte de los tejidos periféricos hacen perder credibilidad a la teoría de Dodd y Dodd.

El modelo de Etkin ha sido confirmado en parte por algunos datos obtenidos hasta la fecha, aunque existen gran cantidad de resultados contradictorios que indican que dicha teoría debe ser revisada y completada. Se necesita mayor información sobre el origen, secreción y niveles circulantes de hormonas distintas a las tiroideas así como sobre el comportamiento de los tejidos periféricos y la implicación de factores externos tales como la temperatura y el fotoperíodo.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS.

Si bien la especie *Bufo arenarum* ha sido utilizada en la Argentina para la realización de numerosos estudios en diversos campos de la Biología, son escasos los trabajos que relacionan el desarrollo y evolución del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides durante el período que abarca la metamorfosis. Se pueden mencionar al respecto algunos trabajos aislados, que identificaron diversos tipos celulares de la hipófisis de ejemplares adultos utilizando la técnica del Azán de Heidenhain y algunas técnicas histoquímicas (Prieto Díaz y Echave LLanos, 1947; Prieto Díaz *et al.*, 1960).

El objetivo principal del presente estudio es el de establecer patrones morfológicos cuantificables de las células productoras de hormonas de la pars distalis y relacionarlos con el desarrollo y evolución de las glándulas tiroides a fin de contribuir a la posible realización de modelos generales que comprendan los acontecimientos anatómicos y fisiológicos que tienen lugar durante la metamorfosis de *Bufo arenarum* y en los que las glándulas tiroides y la hipófisis cumplen un rol importante.

Para ello se estudiaron las modificaciones anatómicas así como las variaciones en el volúmen de la pars distalis y glándulas tiroides que se produzcan durante el desarrollo

larvario y en el primer mes de vida postmetamórfica o juvenil.

Asimismo, utilizando anticuerpos anti hormonas hipofisiarias humanas, se identificaron mediante técnicas inmunocitoquímicas las células de la pars distalis a fin de establecer los posibles patrones de distribución anatómica y de observar la existencia de modificaciones en dicha localización durante el desarrollo.

Con la aplicación de métodos morfométricos y estereológicos se cuantificaron las variaciones que presentan estos tipos celulares, estudiándose los cambios en densidad de volumen y volumen total ocupado por dichas células en la hipófisis durante los distintos estadios del desarrollo en la especie objeto de estudio.

Con el fin de extender las observaciones sobre el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides se evaluó como afecta la inhibición de la actividad de la glándula tiroides, utilizando la sustancia goitrógena perclorato de potasio, el desarrollo y evolución de las células adenohipofisarias y de la misma glándula tiroides en larvas al inicio de la premetamorfosis.

Los resultados cuali- y cuantitativos obtenidos tras la aplicación de las técnicas señaladas, discutidas a la luz de los datos disponibles en la literatura permitieron contribuir a postular un esquema morfofisiológico general que explique

el papel desempeñado por las hormonas adenohipofisarias y de las glándulas tiroides durante el desarrollo de *Bufo arenarum*.

MATERIALES Y METODOS

III. MATERIALES Y METODOS.

III.1. Material biológico.

Obtención y mantenimiento.

Hembras de *Bufo arenarum* fueron recolectadas en las cercanías de la Ciudad de Buenos Aires. La ovulación fue inducida en el otoño por inyección de hipófisis homólogas, almacenadas según Pisanó (1957). Luego de la ovoposición los ejemplares fueron desmedulados, las ristas de ovocitos fueron extraídas del ovisaco mediante una incisión abdominal y colocadas en cápsulas de Petri donde fueron fertilizadas *in vitro* con una suspensión de espermatozoides de la misma especie.

Los embriones obtenidos fueron colocados en cápsulas de Petri y mantenidos en solución de Holtfreter (3,5g NaCl + 0,05g KCl + 0,2g NaHCO₃ + 1000ml agua destilada), hasta que el esbozo de los miembros posteriores se hizo visible. En este estadio fueron transferidos a acuarios (2 l de volumen) con agua de canilla declorada. Debido a que la tasa de crecimiento y el desarrollo larval en anuros están influenciados por factores extrínsecos como la temperatura, el fotoperíodo y la densidad poblacional inicial, hemos estandarizado algunos parámetros de modo tal que las variables experimentales introducidas reflejen sólo las variaciones en los factores intrínsecos. Las larvas fueron mantenidas en una densidad poblacional inicial de 10

ejemplares por litro, a una temperatura de 19-20°C y con un fotoperíodo de 12 L:12 O (Miranda *et al.*, 1993a, b). El medio fue renovado semanalmente y las larvas fueron alimentadas con lechuga hervida *ad libitum*. Periodicamente se verificaba el estadio metamórfico alcanzado por las larvas.

Estadios metamórficos.

Para la especie *Bufo arenarum* han sido confeccionadas dos tablas que describen su desarrollo metamórfico. La de Echeverría y López (1981), que señala 10 estadios, y la de Martin *et al.* (1985), que describe 20 estadios basándose fundamentalmente en las modificaciones de los miembros posteriores y otras características morfológicas externas. Debido a la mayor descripción de estadios por Martin *et al.* (1985) hemos considerado oportuno utilizar esta última tabla para la determinación de los estadios metamórficos.

Martin *et al.* (1985) establece que al final del período embrionario, el ejemplar ha asumido la forma larval con un cuerpo oval y una musculatura caudal aproximadamente 1,5 veces el largo del cuerpo. Esta forma se mantiene sin cambios aparentes hasta el estadio I caracterizado por el esbozo bien manifiesto de los miembros posteriores los que aparecen como una pequeña elevación entre la base de la cola y la base del abdómen. Desde este momento se inicia la *premetamorfosis*, que abarca desde el estadio I al IX, caracterizado fundamentalmente por el crecimiento del esbozo de miembros

posteriores, los que se diferenciarán en auto, zeugo y estilopodio, apareciendo también los esbozos de los 5 dedos del pie. A este período le sigue la *prometamorfosis* que abarca desde el estadio X al XV, caracterizada morfológicamente por el desarrollo del pie que alcanza su forma juvenil típica, y por el crecimiento diferencial de las partes, que comienza a transformar el organismo en la forma adulta. Inicialmente, el cambio más notable es la diferencial aceleración del crecimiento de los miembros posteriores. Los estadios siguientes, del XVI al XX, constituyen la etapa llamada *clímax metamórfico*, durante la cual se producen los cambios aparentemente más drásticos. Durante este periodo ocurre la emergencia de los miembros anteriores que marca el estadio XVI, seguido por otros cambios en la forma general del cuerpo, amplitud de la boca, regresión de la cola, etc; hasta que el ejemplar alcanza la forma juvenil, de vida terrestre.

Los estadios utilizados para los estudios histológicos, inmunocitoquímicos, morfométricos y ultraestructurales fueron los siguientes: IV y VIII (mitad y final de la premetamorfosis), XII y XV (mitad y final de la prometamorfosis), XVII y XX (mitad y final del clímax metamórfico) y postmetamórficos de un mes de vida (*figura 6*). Entre paréntesis se han colocado los equivalentes a los estadios larvales anuros según la tabla de Gosner (1960).

ESTADIO IV (29): El miembro posterior crece en longitud alcanzando una vez y medio el valor de su diámetro.

ESTADIO VIII (34): Hay una elongación del dedo 4, con lo que queda bien determinada su separación de los dedos 3 y 5. Se profundiza la hendidura de los dedos 3-2.

ESTADIO XII (39): Hay un considerable alargamiento del autopodio y de los dedos. Comienza la rotación del miembro. Se esbozan las callosidades de los dedos.

ESTADIO XV (41): Se hace más nítida la pigmentación en las bandas de las patas. En larvas avanzadas, con grandes patas posteriores, el dorso del cuerpo cambia la pigmentación desde un típico color negruzco a un colorido más claro (pardo-marrón) presentando manchas puntiformes de color ocre. Su ubicación es a veces irregular o se disponen simétricamente en hilera, a ambos lados de la línea media dorsal. La piel que cubre la cámara donde se desarrollan los miembros anteriores, se hace más clara y transparente, permitiendo ver con claridad las extremidades prontas a emerger. La completa reabsorción de la pieza cloacal marca este estadio.

ESTADIO XVII (43): Ambos miembros anteriores han aparecido completamente. La boca se amplía llegando al borde posterior de las narinas. Las manchas puntiformes sobre el dorso alcanzan un tinte más vivo y se hallan tanto sobre el fondo claro como sobre las manchas oscuras, observándose que están situadas sobre pequeños tubérculos que corresponden a las

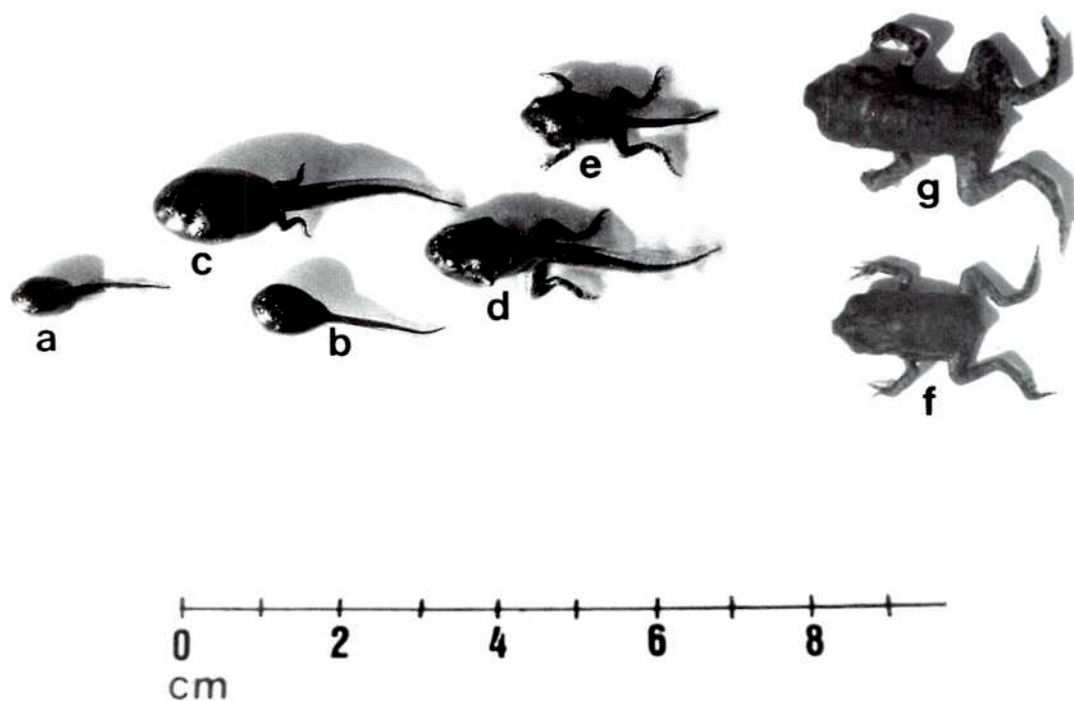


Fig. 6 Estadios metamórficos según Martin *et al.* (1985).
a (estadio IV), b (estadio VIII), c (estadio XII),
d (estadio XV), e (estadio XVII), f (estadio XX),
g (postmetamórficos de 1 mes). (1 x)

glándulas en formación. La cola se reduce drásticamente en longitud, mientras sus aletas sufren un proceso de arrugamiento que concluirá con su total reabsorción.

ESTADIO XX (46): El borde de la boca ha sobrepasado el borde posterior del ojo. La cola ha completado su reabsorción.

POSTMETAMORFICOS: ejemplares que una vez que habían completado la metamorfosis fueron acondicionados en terrarios durante un mes.

Sustancias goitrógenas.

Larvas obtenidas y mantenidas de la manera ya descrita fueron transferidas en estadios de premetamorfosis temprana a acuarios en una densidad de 10 por l y mantenidas en agua declorada con las siguientes concentraciones de perclorato de potasio durante 5 meses. (Este experimento se realizó por triplicado)

Grupo A: 0,034 % KCLO_4 (Mallinckrod)

Grupo B: 0,051 % KCLO_4

Grupo C: CONTROL

Las variaciones en los parámetros morfométricos corporales (longitud total y peso) y de los estadios metamórficos se registraron semanalmente a lo largo de todo el experimento y evaluados por test de ANOVA. Los estudios histológicos,

inmunocitoquímicos, morfométricos y ultraestructurales se llevaron a cabo en larvas mantenidas en solución de KClO_4 (0,034 %) durante 3 y 5 meses, como así también en larvas controles en el mismo estadio metamórfico (VIII) alcanzado por las larvas tratadas.

III.2. Métodos de estudio.

Los ejemplares fueron sacrificados siempre a la misma hora (10 am) para evitar las variaciones debidas a posibles ciclos circadianos de los distintos tipos celulares productores de hormonas.

Previo anestesia con MS 222 (Sandoz), la porción cefálica de las larvas, fue fijada por inmersión en el líquido de Bouin (90 minutos a 4°C y 90 minutos a temperatura ambiente). Este fijador se ha revelado como el más idóneo para la preservación tanto de las estructuras celulares como de la capacidad inmunorreactiva de las hormonas hipofisarias de anfibios (Girod, 1983).

- Una vez fijadas las muestras, se procedió al lavado con alcohol 70° para eliminar los restos de fijador.
- El paso siguiente fue la deshidratación de las piezas con una serie ascendente de alcoholes y su posterior inclusión en parafina-cera.
- De los bloques se obtuvieron cortes transversales (tiroides) y sagitales (hipófisis) seriados de 6µm de

espesor con micrótopo Leitz. Los cortes obtenidos se montaron sobre los portaobjetos con albúmina para coloraciones histológicas convencionales y sin albúmina para inmunocitoquímica.

- Se utilizaron las siguientes técnicas de tinción: Hematoxilina-eosina y Tricrómica de Mallory.
- Las observaciones y mediciones macroscópicas se realizaron con una lupa binocular (Wild), las macrofotografías en un macromicroscopio M 400 (Wild) y todas las observaciones microscópicas así como todas las microfotografías fueron realizadas en un fotomicroscopio Polyvar (Reichert-Jung).

Técnicas inmunocitoquímicas.

Una vez desparafinados e hidratados los cortes, se inmunotñieron con la técnica inmunocitoquímica del complejo ABC (complejo-avidina-biotina), que comprende la secuencia siguiente:

- a) Lavado con PBS (Buffer fosfato salino).
- b) Tratamiento de los cortes con H₂O₂ al 0,3 % durante 15 minutos con el fin de eliminar las peroxidasas endógenas (Zehr, 1978).
- c) Lavado con PBS durante 10 minutos.
- d) Tratamiento con un agente bloqueante de proteínas (leche descremada 5 % + tritón X 100 0,2 % en PBS) durante una hora.

- e) Lavado con PBS durante 10 minutos.
- f) Incubación con el anticuerpo primario específico diluido en PBS en cámara húmeda a 4° C durante 24 hs.
- g) Lavado con PBS durante 10 minutos.
- h) Tratamiento con un agente bloqueante de proteínas (leche descremada 5 % + tritón X 100 0,2 % en PBS) durante 20 minutos (Paz *et al.* ., 1993).
- i) Lavado con PBS durante 10 minutos.
- j) Incubación con el anticuerpo secundario conjugado con biotina (Sigma, USA) diluido en PBS (1:15), durante 45 minutos.
- k) Lavado con PBS durante 10 minutos.
- l) Incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasas (Sigma, USA) diluido en PBS (1:15), durante 45 minuto.
- m) Lavado con PBS durante 10 minutos.
- n) Revelado de la reacción mediante tratamiento con 3,3'-diaminobencidina (DAB, Sigma, USA) y H₂O₂ que actuaría como sustrato de la peroxidasa (Graham y Karnovsky, 1966). Se obtiene así un color marrón por parte de las células inmunorreactivas.
- ñ) Tinción de los núcleos con hematoxilina durante 10 segundos.
- o) Deshidratación y montaje de las preparaciones para su estudio posterior.

Anticuerpos primarios.

A continuación se especifican los anticuerpos utilizados y las diluciones de trabajo:

-anti- β -TSH humana obtenida en conejo (Dako, Dinamarca) a una dilución 1/200.

-anti-1-24-ACTH sintética humana obtenida en conejo (Dako, Dinamarca) a una dilución 1/400.

-anti-PRL humana (Dako, Dinamarca) obtenida en conejo a una dilución 1/100.

-anti-GH humana obtenida en conejo (Penynsula, USA) a una dilución 1/100.

Controles de la especificidad de los anticuerpos primarios.

- a) Omisión del anticuerpo primario, incubándose los cortes con PBS.
- b) Inmunotinción con los antisueros primarios, previamente absorbidos con sus antígenos homólogos durante 2 horas a temperatura ambiente.

Técnicas para microscopia electrónica de transmisión.

Glándulas tiroides de larvas en diferentes estadios de la metamorfosis como así también a los 3 y 5 meses del tratamiento con solución de KClO₄ (0,034 %) fueron extraídas y procesadas para microscopia electrónica.

a) Fijación.

La solución fijadora fue una mezcla de Glutaraldehido al 1 %, Paraformaldehido al 2 % y tampón cacodilato 0,1 M que se preparó al momento de utilizar.

Solución fijadora.

- Tampón cacodilato 0,2 M.....25 cc
 - Glutaraldehido al 25 %..... 2 cc
 - Paraformaldehido al 10 %.....10 cc
 - Agua destilada..... 13 cc
- (se obtienen 50 cc de solución fijadora)

Con estas cantidades, las concentraciones finales de las distintas sustancias son: Glutaraldehido 1%, Paraformaldehido 2 %, y Tampón cacodilato 0,1 %. La fijación se realiza durante 2 horas a 4 °C.

b) Postfijación.

- 1.- Lavado rápido en tampón cacodilato 0.1M a 4°C.
- 2.- Lavado rápido con H₂O destilada (5 veces a temp. amb.).
- 3.- Lavado con H₂O destilada (30 minutos a temp. amb.).
- 4.- Tetróxido de Osmio 2 % (2 horas a 4°C).
- 5.- Lavado rápido con H₂O destilada (5 veces a temp. amb.).

c) Inclusión en Durcupán.

Deshidratación.

- 1.- Alcohol 50° (5 minutos a temp. amb.).
- 2.- Alcohol 70° (5 minutos a temp. amb.).
- 3.- Alcohol 95° (10 minutos a temp. amb.).
- 4.- Alcohol 100° (15 minutos a temp. amb.) (3 veces).
- 5.- Acetona (15 minutos a temp. amb.).

Inclusión.

- 1.- Durcupán ACM (KIT) (FLUKA) 1:1 acetona (2 horas a temp. amb.).
- 2.- Durcupán (puro) (2 horas a temp. amb.).
- 3.- Durcupán (puro) (12 horas a temp. amb.).
- 4.- Armado de los bloques.
- 5.- Polimerización (24 horas a 60° C).

Luego de la inclusión, las piezas fueron cortadas utilizando un ultramicrotomo Reichert Jung (ultracuts), montadas en grillas de cobre, contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las secciones fueron examinadas en un microscopio electrónico Hitachi Hull C.

III.3. Morfometría y Estereología.

Parámetros morfométricos.

Se han obtenido los siguientes parámetros:

1.- Longitud:

Se midió la longitud total (LT), tomada desde el extremo anterior cefálico hasta el ápice de la cola, la longitud del cuerpo (LCU), medida desde el extremo anterior cefálico hasta la cloaca y la longitud de la cola (LCO), que se obtuvo por diferencia entre la longitud total y la longitud del cuerpo. En los ejemplares tratados sólo se midió la longitud total. Todas las mediciones se tomaron en milímetros (mm) sobre 15 ejemplares por estadio y tratamiento.

2.- Peso total húmedo (P):

Según Mc Nab (1970), Bartholomew (1977) y Hota y Dash (1987) el peso húmedo corporal es el mejor estimador del crecimiento corporal larval. El peso húmedo se determinó en una balanza electrónica con una sensibilidad de 0,001 g. Fueron pesados 15 animales a la vez por estadio y tratamiento, secados con papel de filtro en una caja de papel de aluminio previamente tarada.

3.- Volumen de la pars distalis (VPD):

El pequeño tamaño de la hipófisis de las larvas objeto de nuestro estudio imposibilitó el uso del método de inmersión basado en el principio de Arquímedes para la obtención del volumen hipofisiario. En su lugar se midió electrónicamente el área hipofisiaria de todos y cada uno de los cortes seriados de igual espesor (6µm). La suma total de las áreas se multiplicó por el espesor del corte obteniéndose así el volumen hipofisario, de forma que:

$$VPD = t \sum A \mu m^3$$

donde t es el espesor del corte y $\sum A$ la suma total de las áreas.

4.- Numero de células inmunorreactivas:

El número total de células inmunorreactivas TSH, PRL, ACTH y GH (presentando núcleo) fue contado en 5 cortes (3 centrales y dos laterales) para cada uno de los tipos celulares inmunorreactivos identificados en la pars distalis.

5.- Volumen de las glándulas tiroides (VGT):

Se utilizó la misma fórmula que para el cálculo del volumen de la pars distalis.

6.- Número de folículos (NF):

Se contaron todos los folículos presentes en las tiroides en cinco cortes (dos laterales y tres centrales).

7.- Diámetro folicular (DF):

Se consideró únicamente el diámetro del folículo más ancho en cinco cortes (dos laterales y tres centrales).

8.- Altura células foliculares (ACF):

Se midieron 10 células epiteliales (al azar) de folículos tiroideos en cinco cortes (dos laterales y tres centrales).

Los datos evaluados representan los valores medios y los errores estándares de las mediciones realizadas en las tiroides o hipófisis de cinco larvas por estadio y tratamiento. Las mediciones realizadas en glándulas tiroides, fueron tomadas siempre sobre la glándula derecha.

Parámetros estereológicos.

La estereología se puede definir como la rama de las matemáticas aplicadas que obtiene información tridimensional de las estructuras espaciales a partir de secciones bidimensionales por criterios de probabilidad geométrica.

Esta ciencia incluye una serie de parámetros estructurales espaciales de los cuales hemos utilizado el siguiente:

Densidad de volúmen (Vv).

Determina el porcentaje de volúmen total de una muestra determinada ocupado por sus componentes. Lo expresamos en tantos por uno.

Fue el geólogo francés Delesse (1847) quién demostró que la densidad de volúmen de los distintos componentes de una roca puede estimarse sobre secciones al azar midiendo áreas relativas de sus perfiles, de tal manera que:

$$Vv = Ao/At = Vo/vt$$

donde Ao es el área total de los perfiles de los objetos contenidos en el corte, At es el área total de la sección, Vo es el volúmen de los objetos contenidos en el corte y Vt el volúmen total del corte, tratándose pues de dividir el volúmen del contenido por el volúmen del continente. la densidad de volumen constituye uno de los principios fundamentales de la estereología.

Se han medido 5 cortes (los mismos donde se contó el número celular) en cinco larvas para cada uno de los tipos celulares inmunorreactivos identificados presentes en la pars distalis, obteniéndose un total de 25 mediciones por estadio y tratamiento para cada tipo celular.

Parámetros secundarios.

Volúmen total ocupado por los distintos tipos celulares (V).

Basándonos en los datos obtenidos de la densidad de volúmen de los distintos tipos celulares y en el volúmen total de pars distalis se obtuvo un nuevo parámetro: el volúmen total ocupado por los distintos tipos celulares.

En el caso del parámetro volúmen total ocupado por las células inmunorreactivas de la pars distalis (V), el valor medio y su error típico se calcularon de la siguiente manera:

$$VPD_1 \times Vv_1 \pm VPD_1 \times e_1 = V_1 \pm ET_1$$

donde VPD_1 es el volúmen de la pars distalis de un ejemplar, que es una constante, Vv_1 la densidad de volúmen media y e_1 el error típico de dicho animal.

El valor medio del volúmen de cada tipo celular se calculó en 5 ejemplares por estadio y tratamiento de la siguiente manera:

$$\bar{V} = \frac{V_1 + V_2 + \dots + V_N}{N}$$

donde N es el número de ejemplares.

El error típico del volumen medio se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$ET = \sqrt{\frac{ET_1^2 + ET_2^2 + \dots + ET_N^2}{N}}$$

siendo N el número de ejemplares.

El cálculo de los parámetros morfométricos y estereológicos se llevó a cabo en medidas realizadas en dos imágenes sobre imágenes microscópicas introducidas desde un microscopio óptico Polyvar (Reichter-Jung) mediante cámara de televisión en un analizador automático de imágenes VIDAS VER:2.1 (Kontron, Elektronik, Germany) siguiendo las fórmulas estereológicas de Weibel (1979) para el análisis de imagen.

III.4. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron analizados por test "t" de Student, "U" test Mann-whitney para datos no homogéneos y análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias entre grupos. Si el valor F era significativo al $P < 0,05$, se han utilizado comparaciones de Bonferroni para evaluar diferencias entre grupos. Los resultados representan valores medios y sus errores estándares. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa para computador GraphPad.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS.

IV.1. Desarrollo y evolución de la pars distalis hipofisaria y de las glándulas tiroides en condiciones normales.

V.1.1. Morfométricos corporales.

Longitud. (Figura 7, Tabla I)

Se observó para la especie estudiada *Bufo arenarum* un crecimiento significativo en *longitud total (LTO)* durante la pre- y prometamorfosis. Hacia el final de la prometamorfosis las larvas presentaron su tamaño máximo que fue aproximadamente el doble de los valores observados al comienzo de la premetamorfosis. Al inicio del clímax metamórfico se produjo una disminución en los valores observados de la longitud total de tal forma que al final de la metamorfosis equivalían a la mitad de la longitud máxima alcanzada. Los ejemplares postmetamórficos experimentaron un crecimiento en longitud cercano al 30% con respecto a los valores obtenidos al final del clímax. La *longitud corporal (LCU)*, aumentó notablemente hasta el final de la prometamorfosis, luego disminuyó hasta la mitad del clímax, para volver a aumentar hacia el final de la metamorfosis. La *longitud caudal (LCO)* aumentó hasta la mitad de la prometamorfosis. Hacia el final de esta etapa y durante el clímax metamórfico la cola disminuye su longitud hasta su total desaparición.

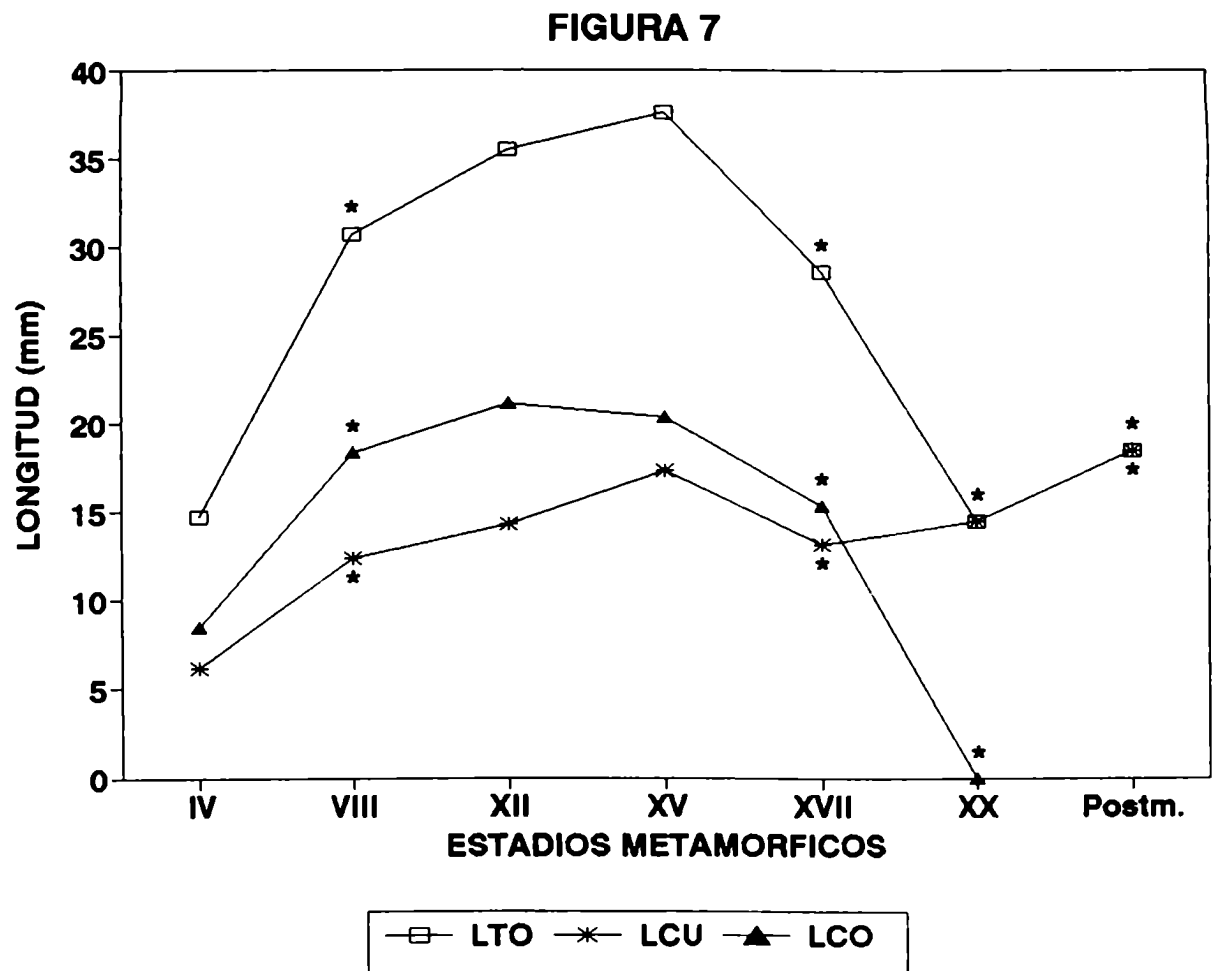


Fig. 7 Longitud total (LTO), corporal (LCU), caudal (LCO) de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Se representan valores medios (N= 15), *P<0,05 respecto del estadio anterior.

Peso total húmedo (P). (Figura 8, Tabla I)

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

IV.1.2. Inmunocitoquímicos y morfométricos pars distalis.

Evolución anatómica pars distalis. (Figuras 9, 10)

En larvas de *Bufo arenarum*, la hipófisis se encuentra ubicada por debajo del cerebro medio, está conectada con el lóbulo hipotalámico por la eminencia media y por los vasos portales. De color blanquecina-rosácea y forma similar a un sombrero se destacan macroscopicamente la adenohipófisis y la neurohipófisis (*Fig. 9*). A nivel microscópico se observa que la hipófisis se encuentra ubicada debajo del III hemisferio cerebral, sobre el cartílago basiesfenoides. Pueden distinguirse claramente la pars distalis, pars intermedia, pars nervosa y eminencia media desde estadios premetamórficos tempranos (*Figs. 10a, b*). En la especie estudiada se ha observado que, al comienzo de la premetamorfosis, la pars distalis se sitúa en posición ventro-rostral con respecto a la pars intermedia y por debajo de la eminencia media. A lo largo de la metamorfosis, la pars distalis se va desplazando

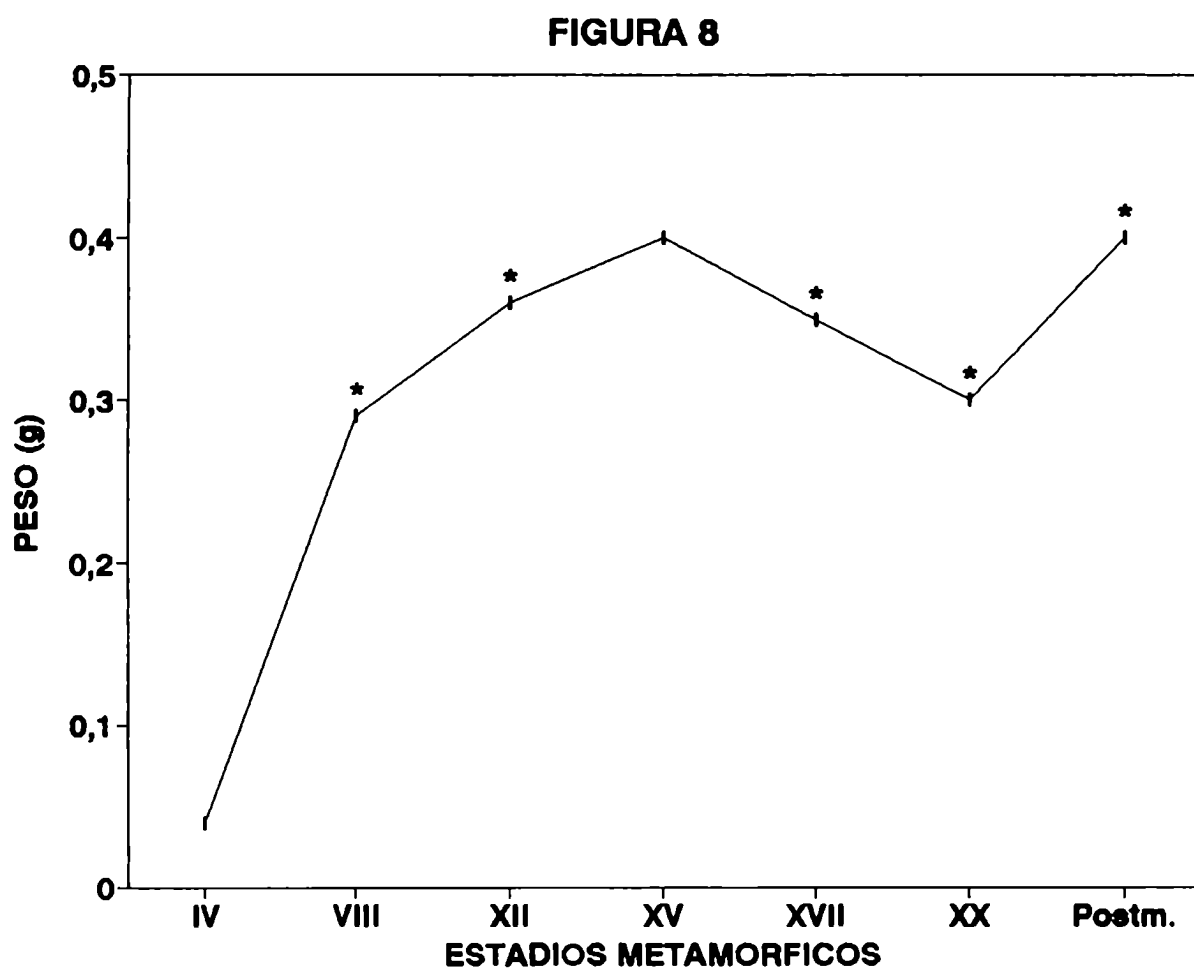


Fig. 8 Peso húmedo (P) de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Se representan los valores medios (N= 15), *P<0,05 respecto del estadio anterior.

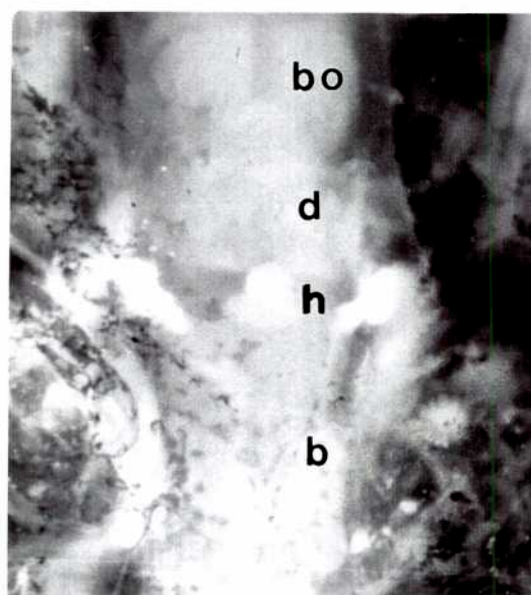


Fig. 9 Observación macroscópica de la hipófisis de larva prometamórfica de *Bufo arenarum*. bo, bulbo olfatorio; d, diencéfalo; h, hipófisis; b, bulbo. (5 x)

bajo la pars intermedia hacia posiciones más caudales, observándose también un mayor desarrollo de la eminencia media y de la pars nervosa (*Figs. 10c, d*). La configuración observada en los ejemplares postmetamórficos aún no correspondía con la propia de adultos (*Fig. 10e*). A mayor aumento con la coloración de Mallory pueden observarse diversos tipos celulares. Principalmente se distinguen células acidófilas que toman una coloración rojiza (posiblemente células productoras de prolactina y hormona del crecimiento) y células basófilas que adquieren una coloración violeta-azulada (posiblemente células productoras de tirotrófina y de adrenocorticotropina) (*Fig. 10f*).

Volumen de la pars distalis (VPD). (Figura 11, Tabla II)

A lo largo de la pre- y de la prometamorfosis se observó un aumento significativo del VPD que al final de la prometamorfosis (estadio XV) alcanza el máximo valor. Al inicio del clímax metamórfico, se observó un descenso volumétrico que fue continuo hasta el final de la metamorfosis e inclusive en ejemplares postmetamórficos.

Distribución células inmunorreactivas.

Por medio de técnicas inmunocitoquímicas fueron identificadas células TSH, PRL, GH y ACTH en la pars distalis de *Bufo arenarum* en todos los estadios estudiados, no observándose inmunorreacción cuando los anticuerpos primarios

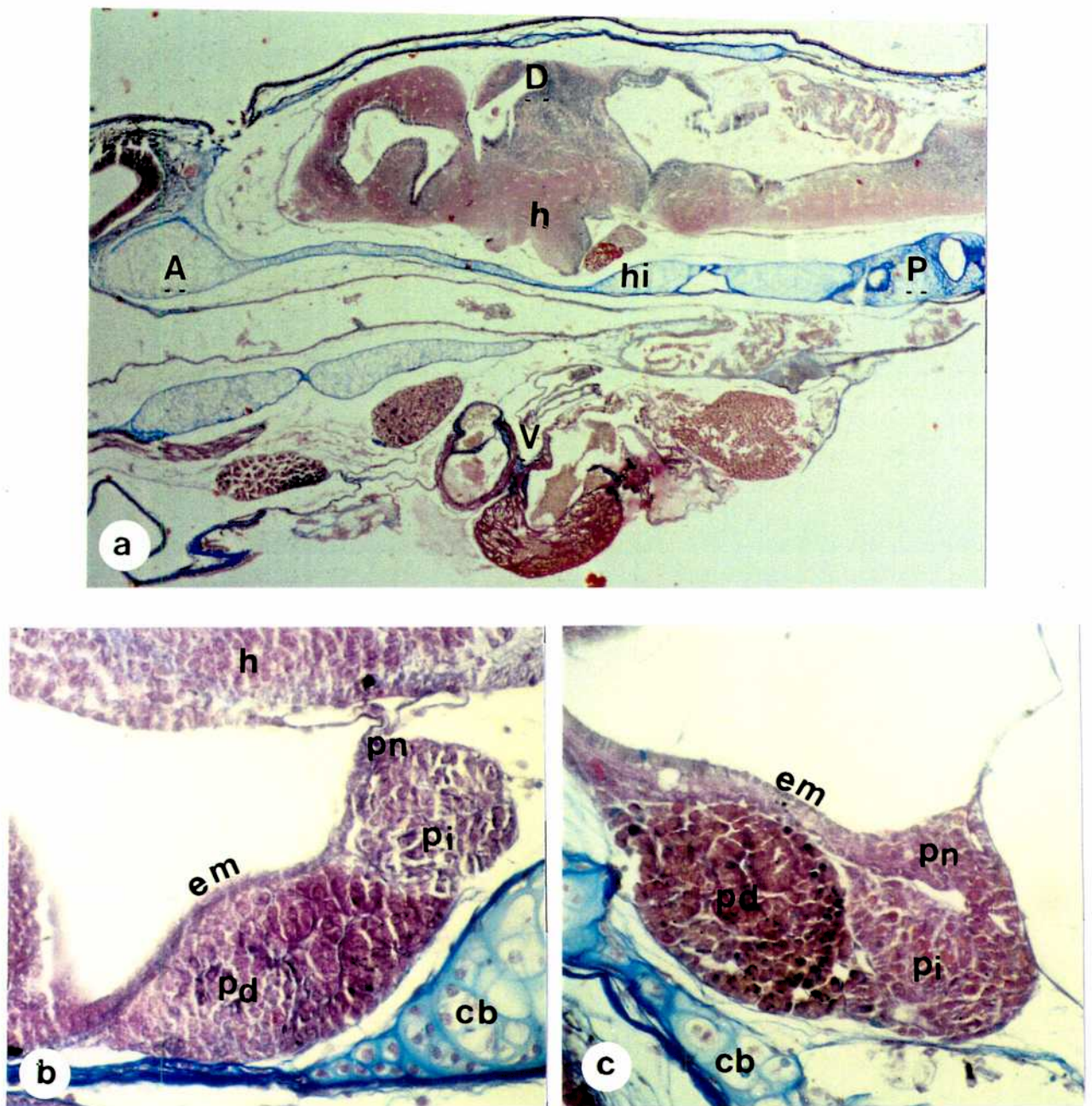


Fig. 10 Evolución anatómica de la hipófisis de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. (a,b) premetamorfosis, (c) prometamorfosis, (d) (f) clímax metamórfico, (e) postmetamorfosis. h, hipotálamo; hi, hipófisis; pa, pars anterior; pi, pars intermedia; pn, pars nervosa; em, eminencia media; cb, cartílago basiesfenoides. A rostral o anterior, P caudal o posterior, D dorsal, V ventral. (a) (100 x); (b,c,d,e) (400 x); (f) (1000 x)

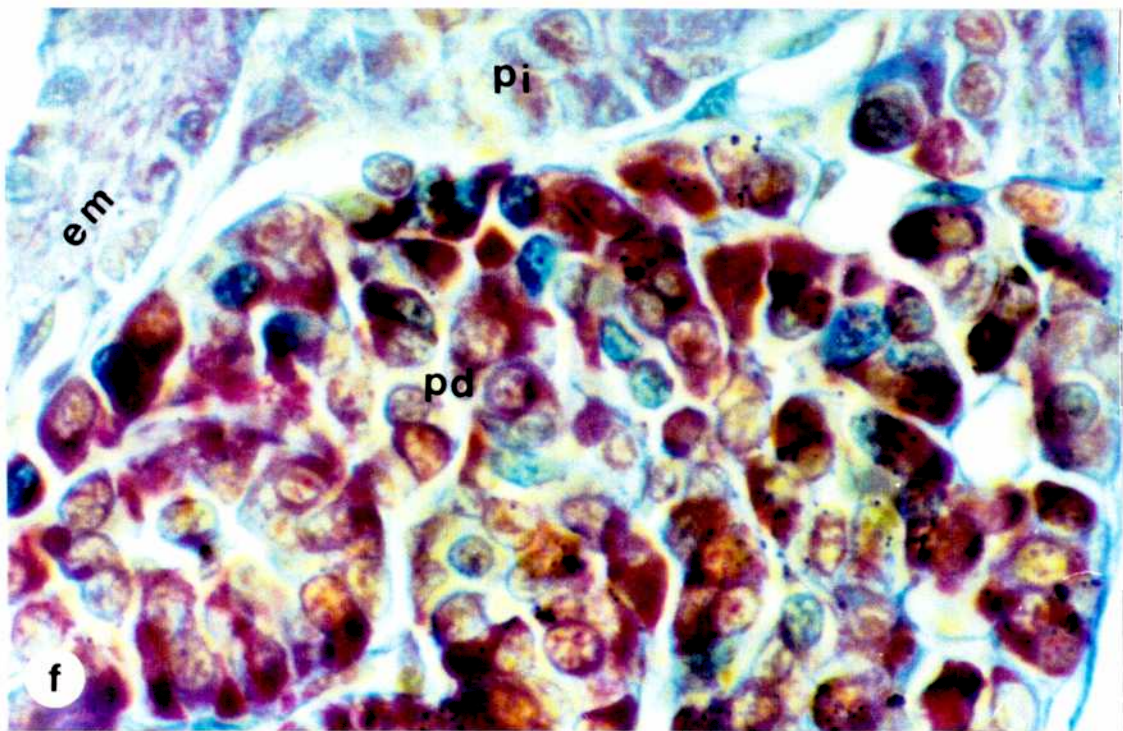
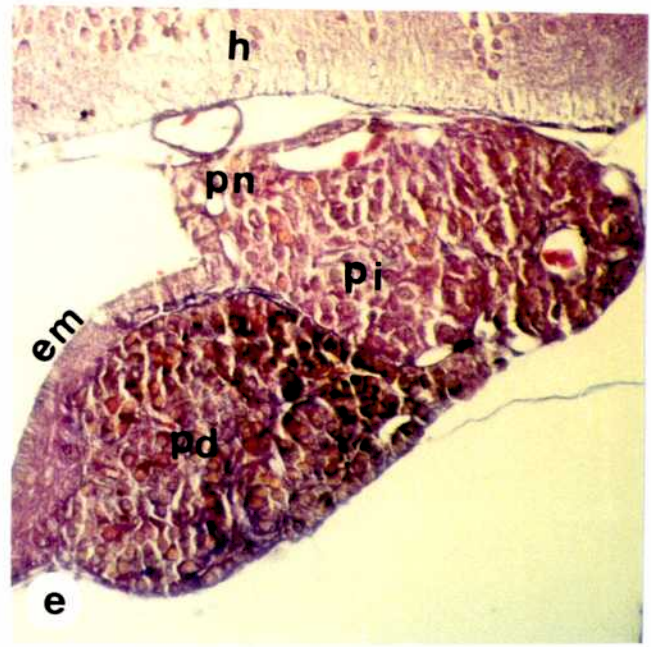
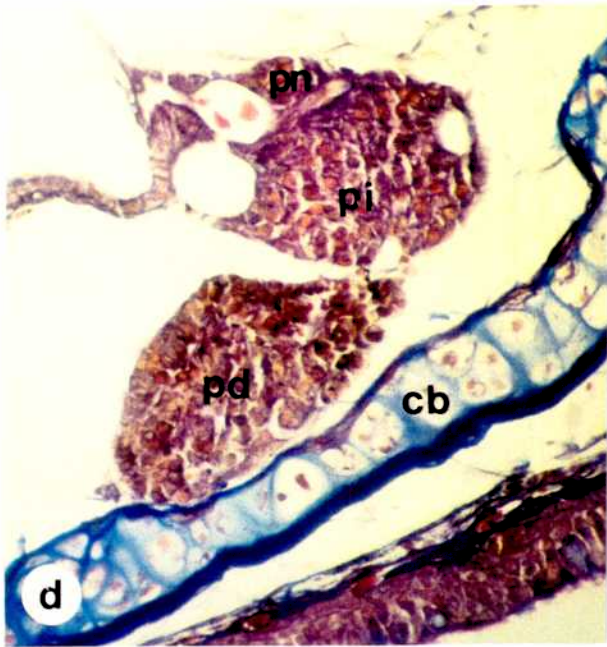


Fig. 10 Continuación

FIGURA 11

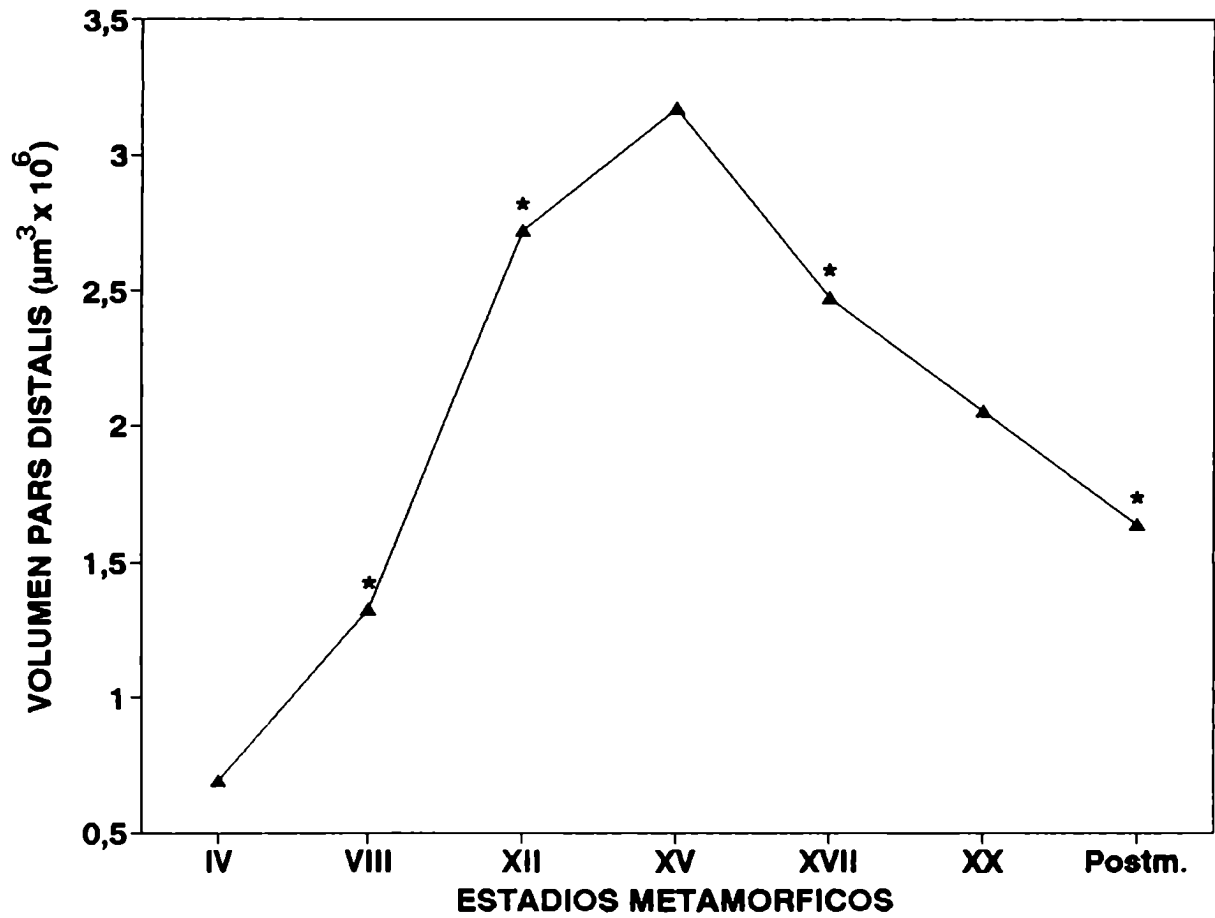


Fig. 11 Volumen de la pars distalis de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Se representan valores medios (N=5), * $P < 0,05$ respecto del estadio anterior.

fueron sustituidos por PBS o cuando se incubó con los anticuerpos primarios previamente preabsorbidos con antígenos homólogos.

Células TSH. (Figura 12)

Este tipo celular fue localizado desde estadios premetamórficos principalmente en la región centroventral de la pars distalis (*Figs. 12a, b*). Durante la prometamorfosis (*Figs. 12c, d*), el clímax metamórfico (*Figs. 12e, f*) y postmetamorfosis (*Fig. 12g*) se mantuvo el mismo patrón de distribución. Hacia el final del clímax y en ejemplares postmetamórficos se observa una menor inmunorreacción de las células TSH (*Figs 12f, g*). Las células TSH inmunorreactivas mostraron una forma poligonal, oval o elipsoidal.

Células PRL. (Figura 13)

Las células de PRL se identificaron dispersas por toda la pars distalis a excepción de la zona caudal (los 2/3 anteriores de la glándula) durante la premetamorfosis (*Figs. 13a, b*) y la prometamorfosis (*Figs. 13c, d*) y el patrón de distribución no se modificó durante el clímax (*Figs. 13e, f*) y en ejemplares postmetamórficos (*Fig. 13g*). Las células de PRL se revelaron polimórficas con tamaños no uniformes (*Fig. 13h*).

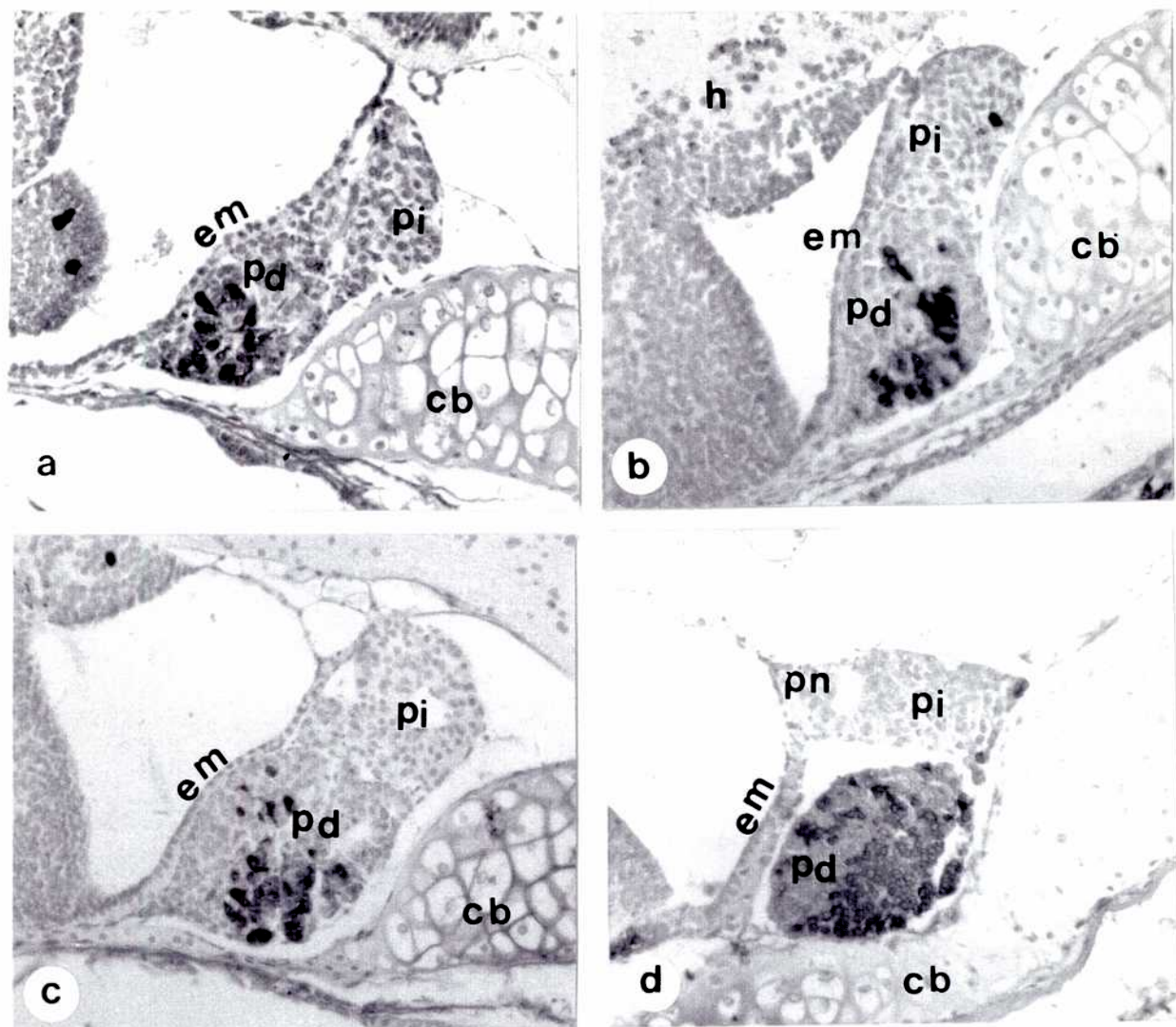


Fig. 12. Cortes mediosagittales de hipófisis de *Bufo arenarum* mostrando células TSH inmunorreactivas. Rostral a la izquierda. (a) premetamorfosis (estadio IV), (b) premetamorfosis (estadio VIII), (c, h) prometamorfosis (estadio XII), (d) prometamorfosis (estadio XV), (e) clímax metamórfico (estadio XVII), (f) clímax metamórfico (estadio XX), (g) postmetamorfosis. pd, pars distalis; pi, pars intermedia; pn, pars nervosa; em, eminencia media. (a,b,c,d,e,f,g) (250 x); (h) (1000 x)

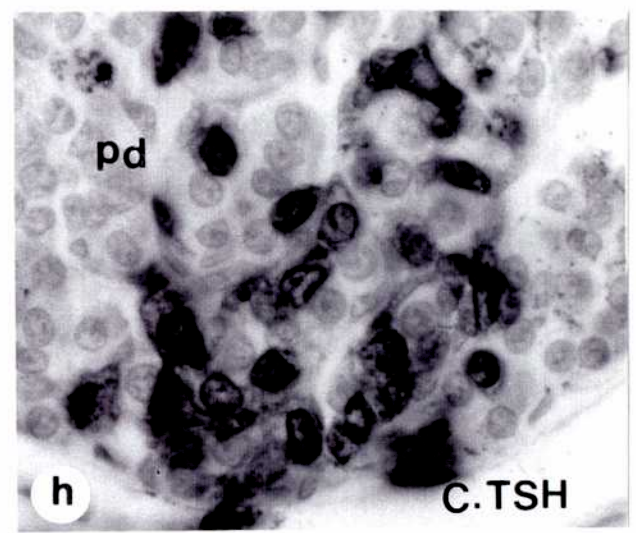
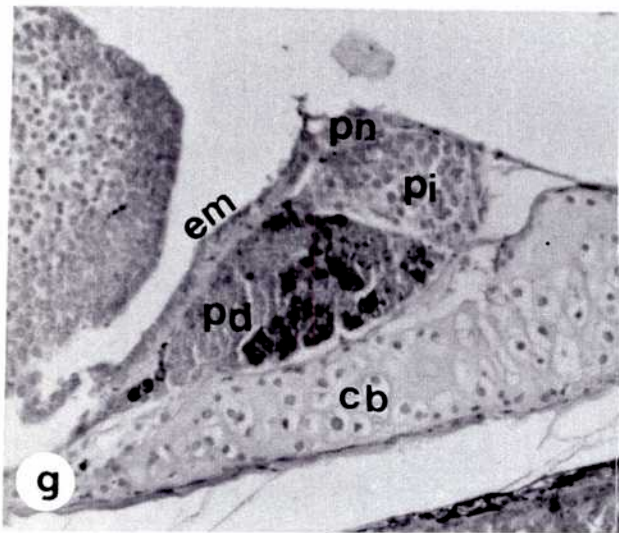
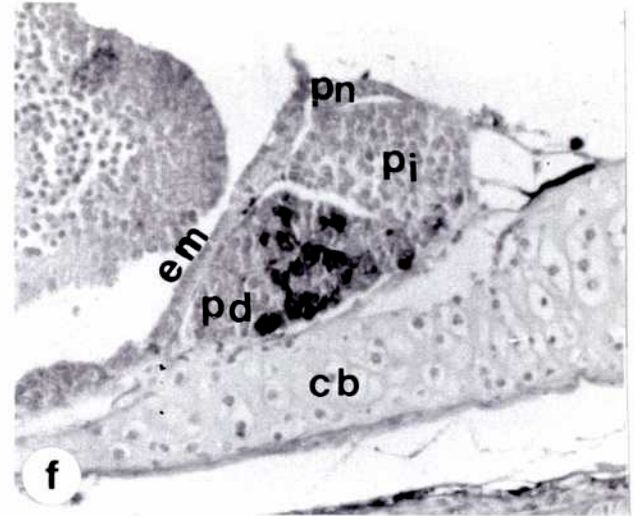
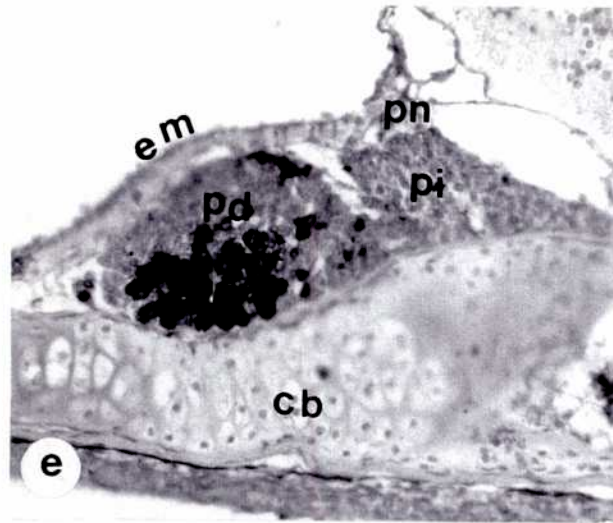


Fig. 12 Continuación.

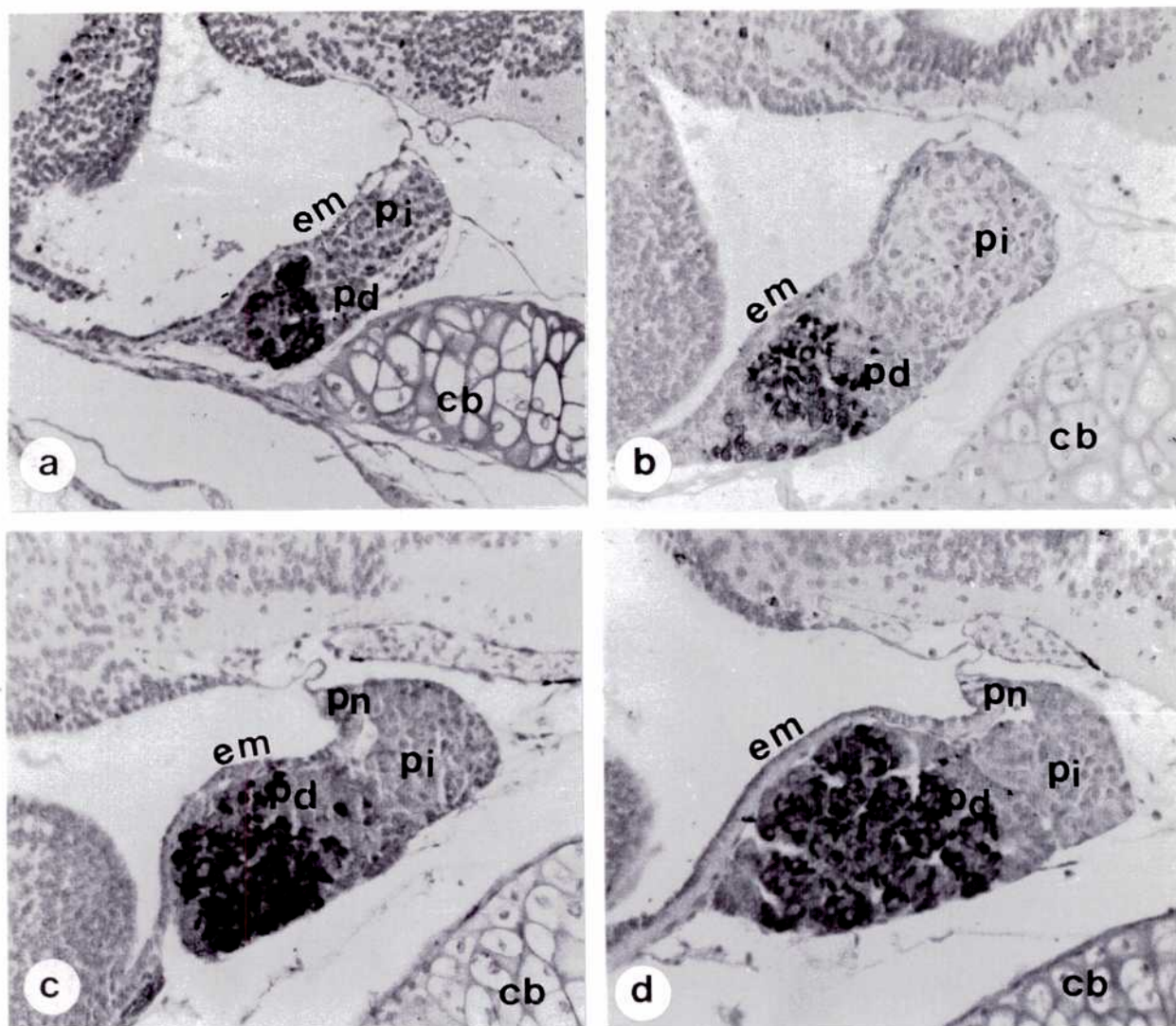


Fig. 13 Cortes mediosagitales de hipófisis de *Bufo arenarum* mostrando células PRL inmunorreactivas. Rostral a la izquierda. (a, h) premetamorfosis (estadio IV), (b) premetamorfosis (estadio VIII), (c) prometamorfosis (estadio XII), (d) prometamorfosis (estadio XV), (e) clímax metamórfico (estadio XVII), (f) clímax metamórfico (estadio XX), (g) postmetamorfosis. pd, pars distalis; pi, pars intermedia; pn, pars nervosa; em, eminencia media. (a,b,c,d,e,f,g) (250 x); (h) (1000 x)

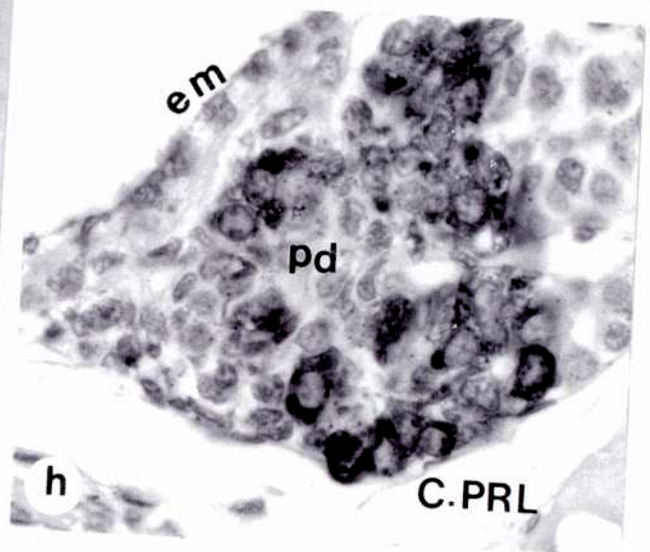
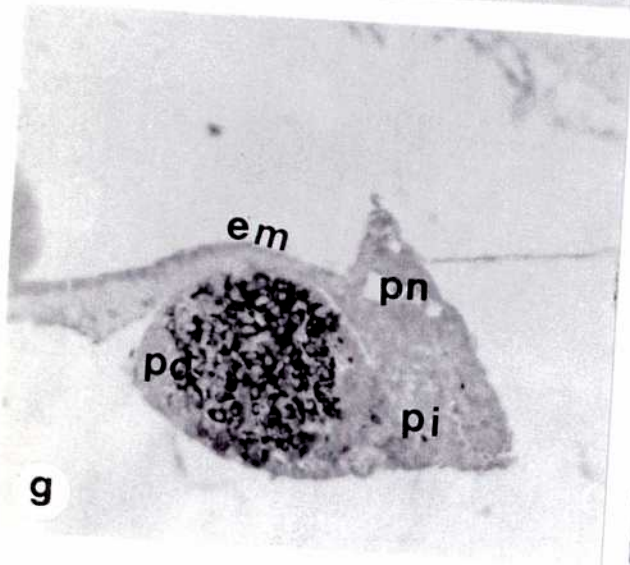
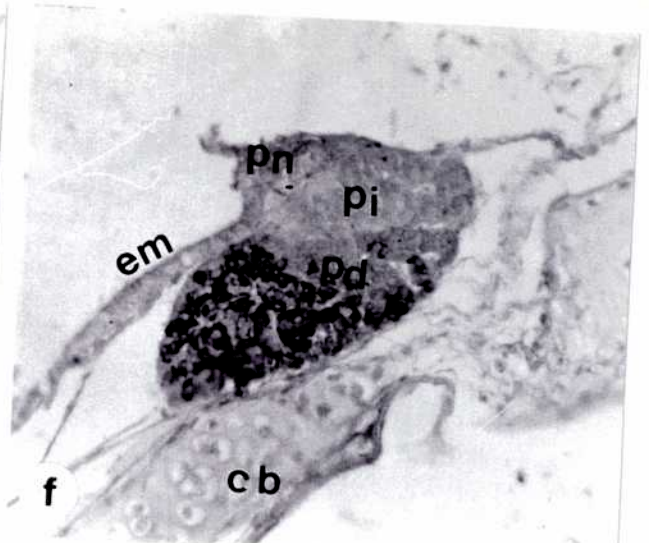
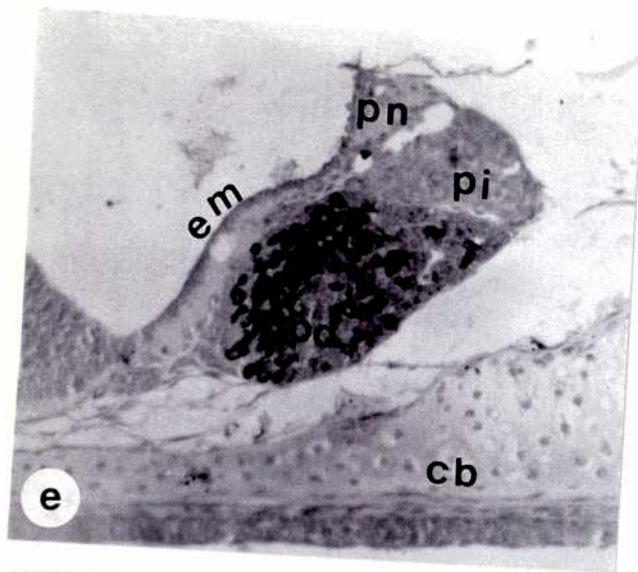


Fig. 13 Continuación.

Células GH. (Figura 14)

Se identificaron células GH en las zonas central y caudal en estadios premetamórficos (*Figs. 14a, b*). En estadios prometamórficos (*Figs. 14c, d*), de clímax (*Figs. 14e, f*) y postmetamorfosis (*Fig. 14g*), las células GH se identificaron únicamente en la región caudal, principalmente en la zona de contacto con la pars intermedia. Se observó una menor inmunorreacción al final del clímax (*Fig. 14f*) y en animales ya metamorfoseados (*Fig. 14g*). Las células GH se presentaron con forma esférica y de tamaño regular (*Fig. 14h*).

Células ACTH. (Figura 15)

Durante la premetamorfosis (*Figs. 15a, b*) las células de ACTH aparecieron esparcidas por la región anterior de la pars distalis debajo de la eminencia media, observándose una inmunorreacción débil. Con el avance del desarrollo (*Figs. 15c, d, e*) se ubicaron en las zonas rostral y dorsal revelando una inmunomarcación más intensa. Hacia el final del clímax y en juveniles las células ACTH mantuvieron la misma distribución pero se ubicaron principalmente en la zona rostral de la pars distalis. Las células ACTH inmunorreactivas presentaron una forma elipsoidal y oval (*Fig. 15h*). Es importante mencionar que se observó marcación en las células de la pars intermedia con el anticuerpo utilizado.

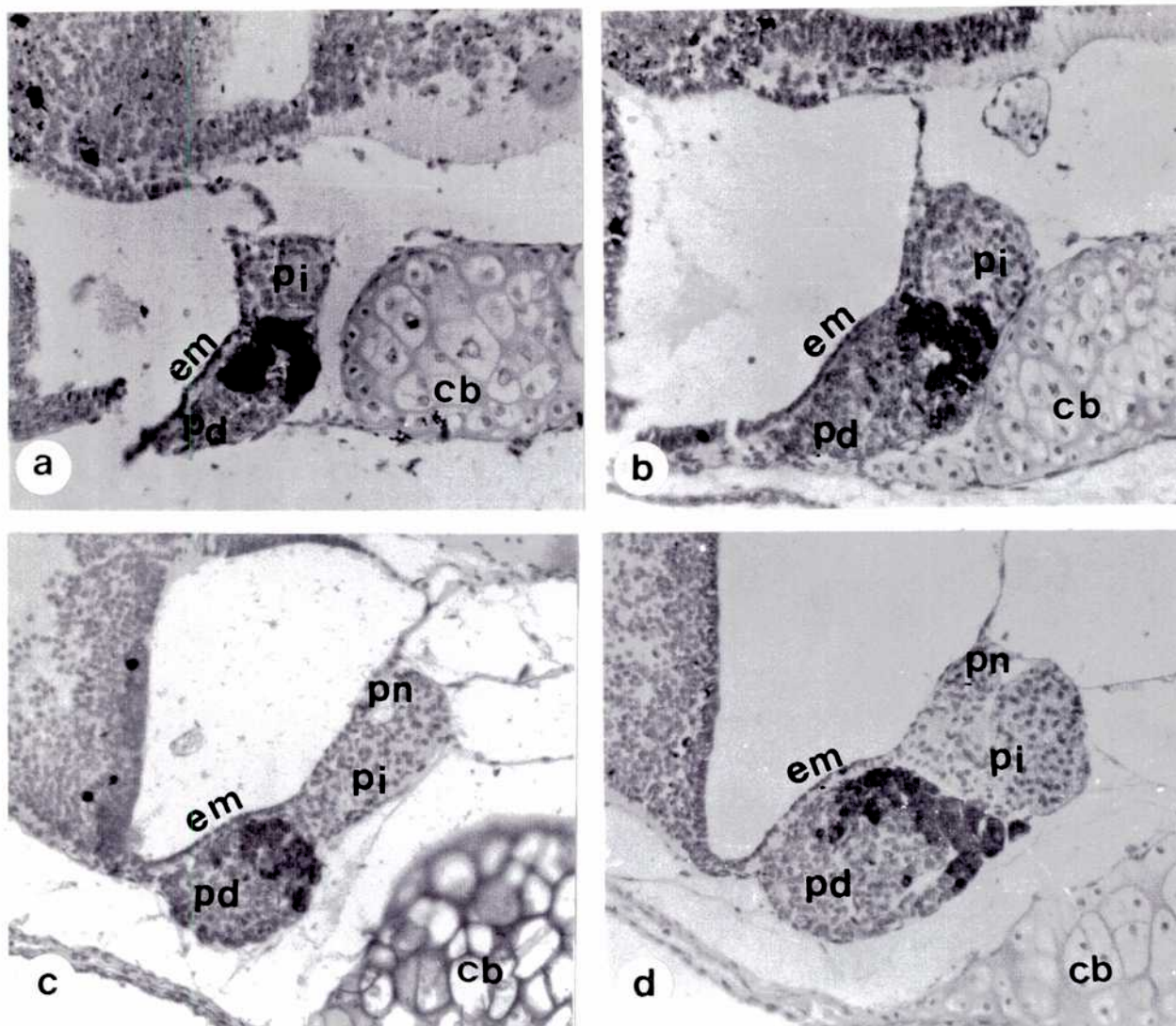


Fig. 14 Cortes mediosagitales de hipófisis de *Bufo arenarum* mostrando células GH inmunorreactivas. Rostral a la izquierda. (a) premetamorfosis (estadio IV), (b) premetamorfosis (estadio VIII), (c) prometamorfosis (estadio XII), (d, h) prometamorfosis (estadio XV), (e) clímax metamórfico (estadio XVII), (f) clímax metamórfico (estadio XX), (g) postmetamorfosis. pd, pars distalis; pi, pars intermedia; pn, pars nervosa; em, eminencia media. (a,b,c,d,e,f,g) (250 x); (h) (1000 x)

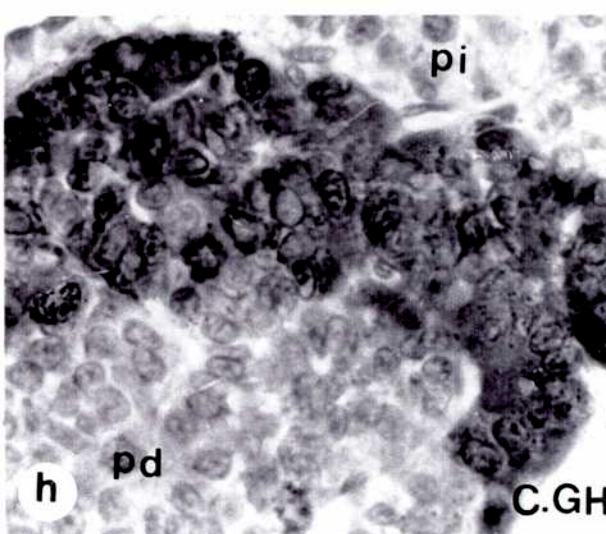
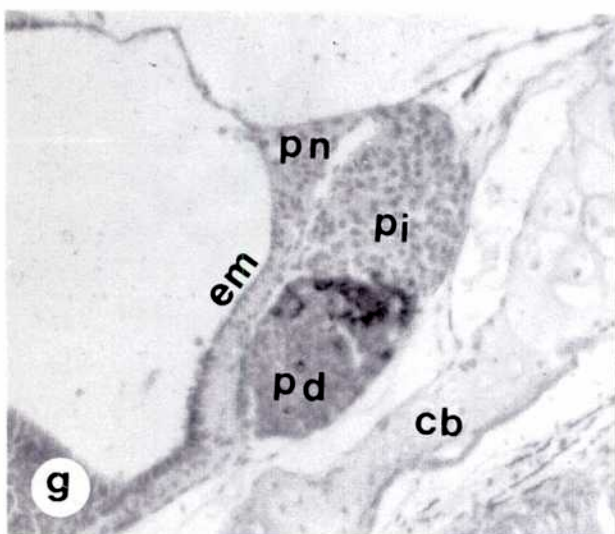
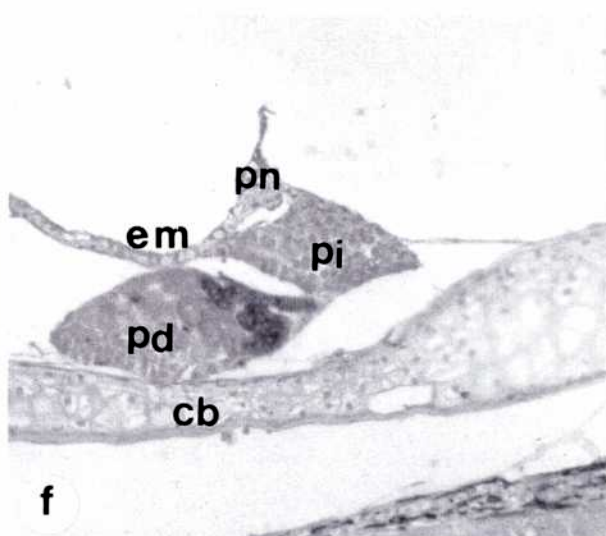
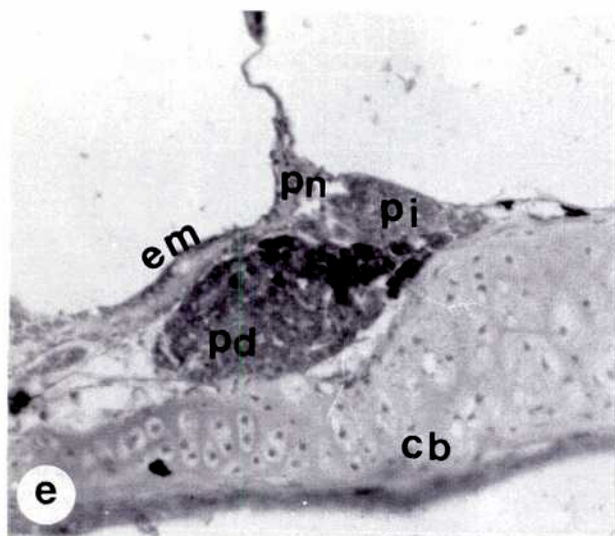


Fig. 14 Continuación.

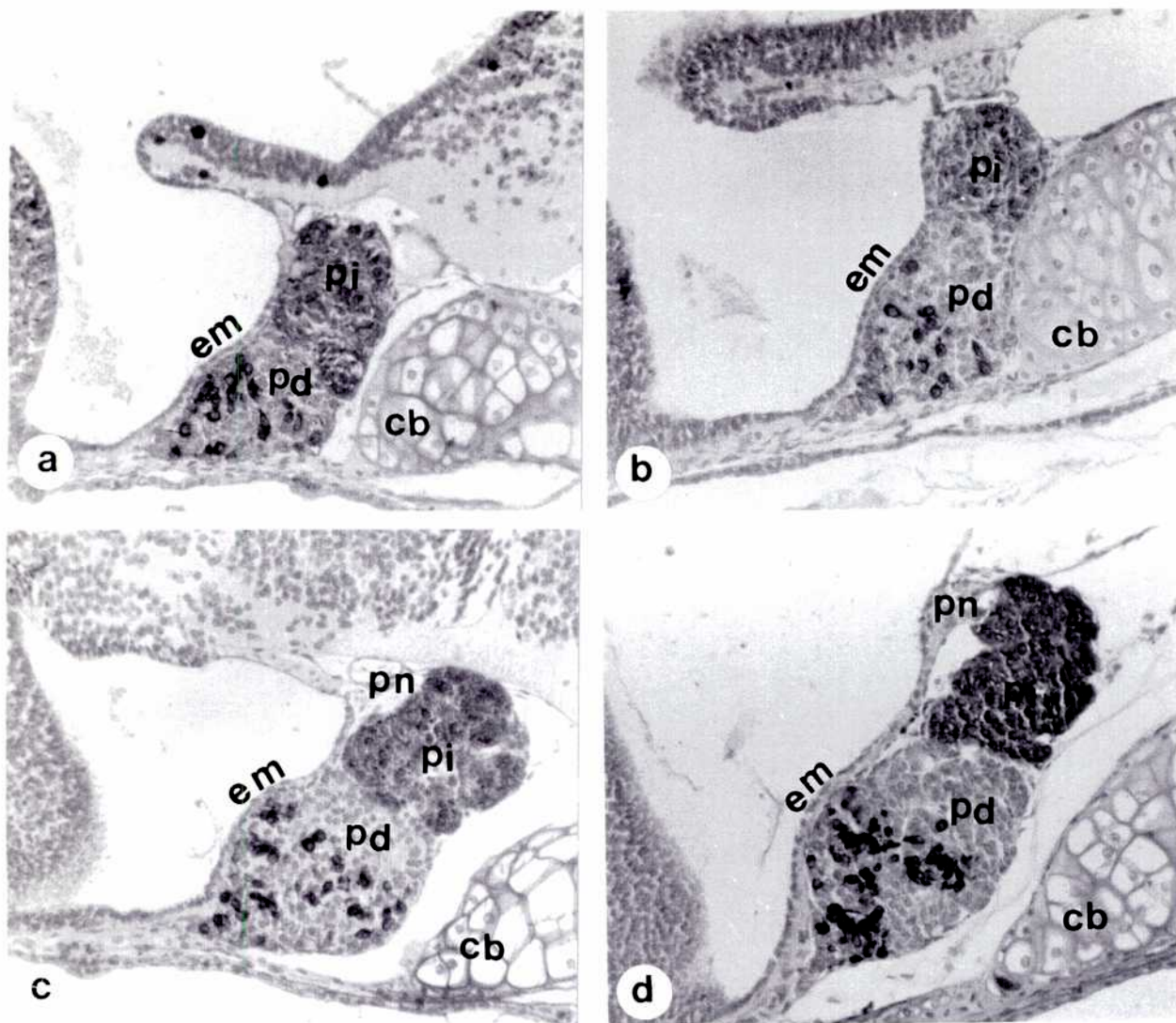


Fig. 15 Cortes mediosagitales de hipófisis de *Bufo arenarum* mostrando células ACTH inmunorreactivas. Rostral a la izquierda. (a) premetamorfosis (estadio IV), (b) premetamorfosis (estadio VIII), (c,h) prometamorfosis (estadio XII), (d) prometamorfosis (estadio XV), (e) clímax metamórfico (estadio XVII), (f) clímax metamórfico (estadio XX), (g) postmetamorfosis. pd, pars distalis; pi, pars intermedia; pn, pars nervosa; em, eminencia media. (a,b,c,d,e,f,g) (250 x); (h) (1000 x)

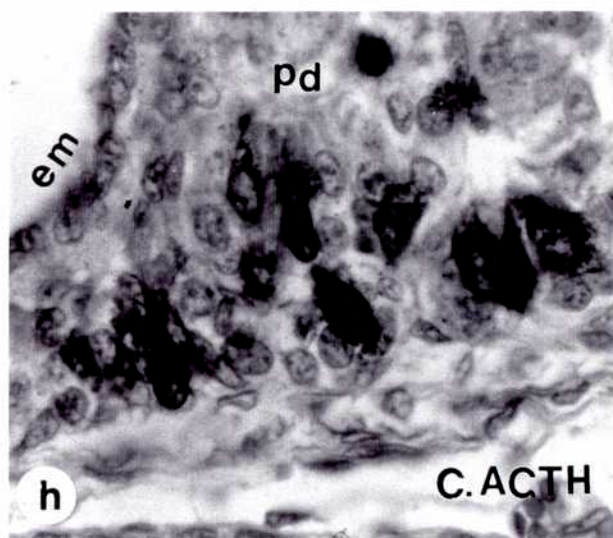
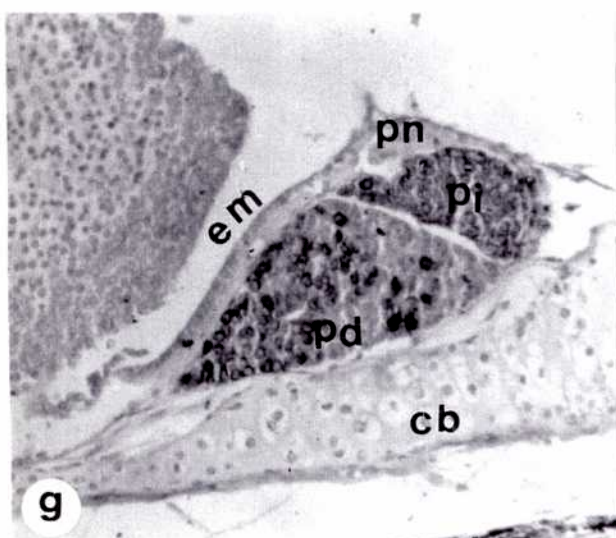
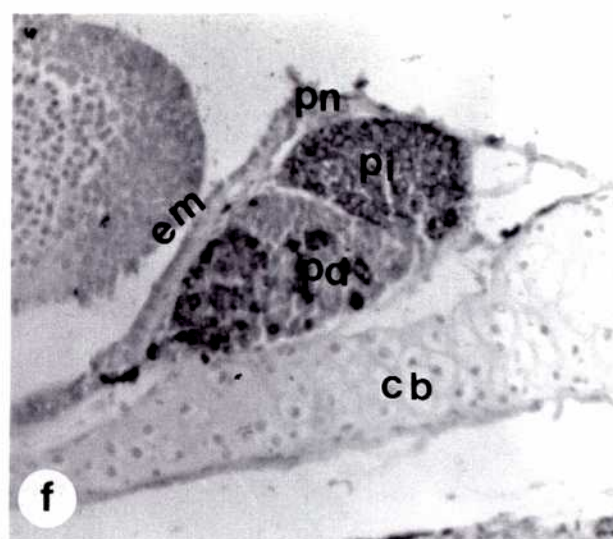
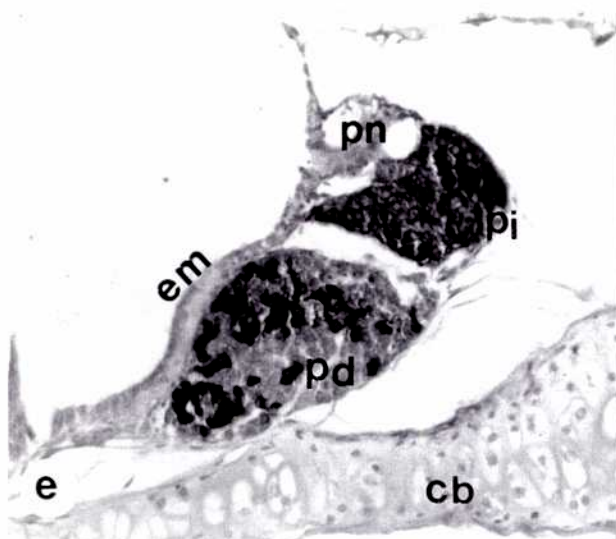


Fig. 15 Continuación.

Número de células inmunorreactivas. (Figura 16, Tabla III)

Durante la pre- y la prometamorfosis, las células TSH se incrementaron significativamente en número. A través del clímax metamórfico fue observado un considerable descenso en la población de esta clase de células. Con el avance del desarrollo larval las células de PRL incrementaron su número hasta la mitad del clímax (estadio XVII). Al final de la metamorfosis (estadio XX) se observó una pronunciada disminución en su número. Las células GH se incrementaron significativamente hasta la mitad de la prometamorfosis (estadio XII); al final de la prometamorfosis (estadio XV) y durante el clímax se observó un marcado descenso. La población de células ACTH no sufrió modificaciones durante la premetamorfosis, se incrementó durante la prometamorfosis, disminuyó suavemente en la mitad del clímax y se incrementó nuevamente al final de la metamorfosis. En los animales postmetamórficos, el número de células TSH continuó disminuyendo, las células de PRL y ACTH mostraron un fuerte incremento y las GH aumentaron suavemente si se comparan con lo observado al final de la metamorfosis.

Densidad de volúmen (Vv). (Figura 17, Tabla IV)

En las células TSH la Vv mostró un leve incremento durante el desarrollo, llegando al máximo al final de la prometamorfosis (estadio XV); una disminución se observó en la Vv durante el clímax e inclusive en los animales

FIGURA 16

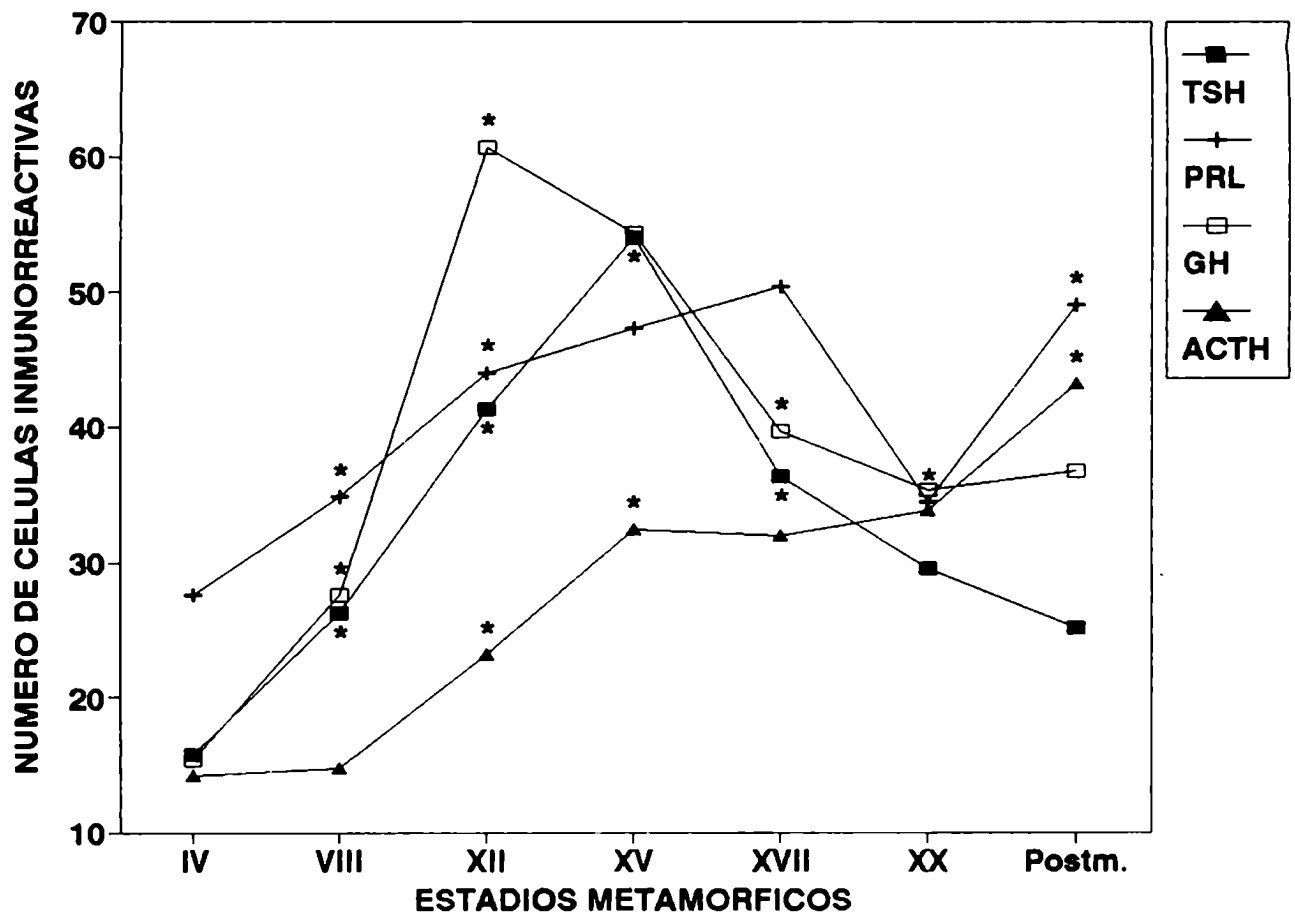


Fig. 16 Número de células inmunorreactivas TSH, PRL, GH y ACTH en la hipófisis de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Se representan valores medios (N=5), *P<0,05 respecto del estadio anterior.

metamorfoseados. Después de una disminución al final de la premetamorfosis (estadio VIII) este parámetro en las células de PRL se incrementó hasta la mitad del clímax (estadio XVII). Al final de la metamorfosis la Vv decreció nuevamente y en postmetamórficos se observó un aumento significativo. En las células GH la Vv mostró una disminución moderada hasta el final de la premetamorfosis (estadio VIII), se incrementó hasta la mitad de la prometamorfosis (estadio XII), disminuyó hasta la mitad del clímax (estadio XVII) y se incrementó nuevamente al final de la metamorfosis como así también en postmetamórficos. Después de una suave disminución hasta la mitad de la prometamorfosis (estadio XII) la Vv de las células ACTH mostró un incremento hasta el final de la metamorfosis. En los ejemplares metamorfoseados este parámetro no varió con respecto a los valores registrados en el estadio XX.

Volumen total ocupado (V). (Figura 18, Tabla V)

El V por las células TSH, PRL, GH, y ACTH mostró un considerable incremento durante el desarrollo hasta el final de la prometamorfosis. Durante el clímax metamórfico se observó una disminución en este parámetro, a excepción del V por las células ACTH que sufrió un leve incremento hacia el final de la metamorfosis. En juveniles solamente el V por las células PRL aumentó significativamente, los V ocupados por las células TSH y GH continuaron disminuyendo y el V por las células ACTH no se modificó.

FIGURA 17

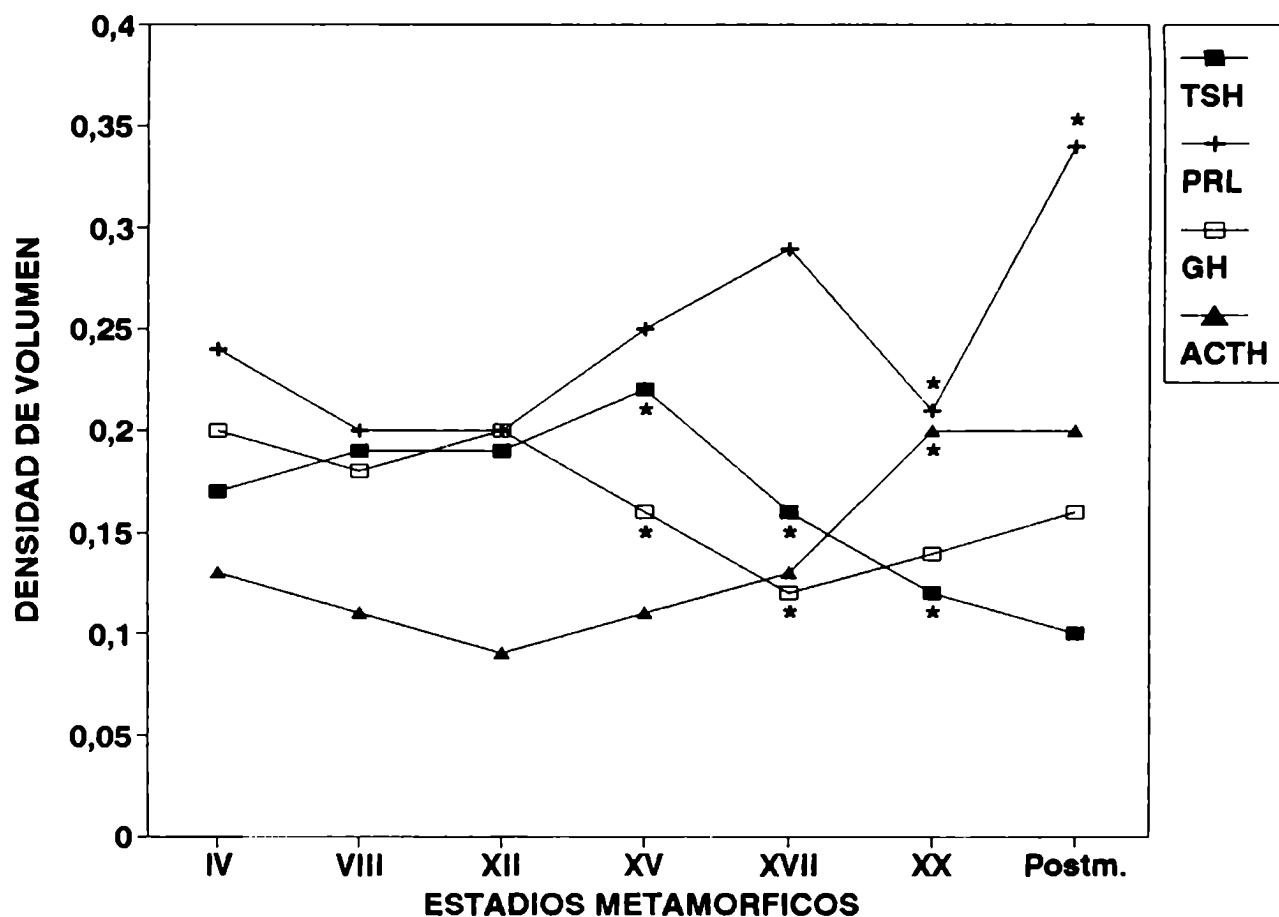


Fig. 17 Densidad de volumen (Vv) de las células inmunorreactivas TSH, PRL, GH y ACTH, en la hipófisis de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Se representan valores medios (N=5), *P<0,05 respecto del estadio anterior.

FIGURA 18

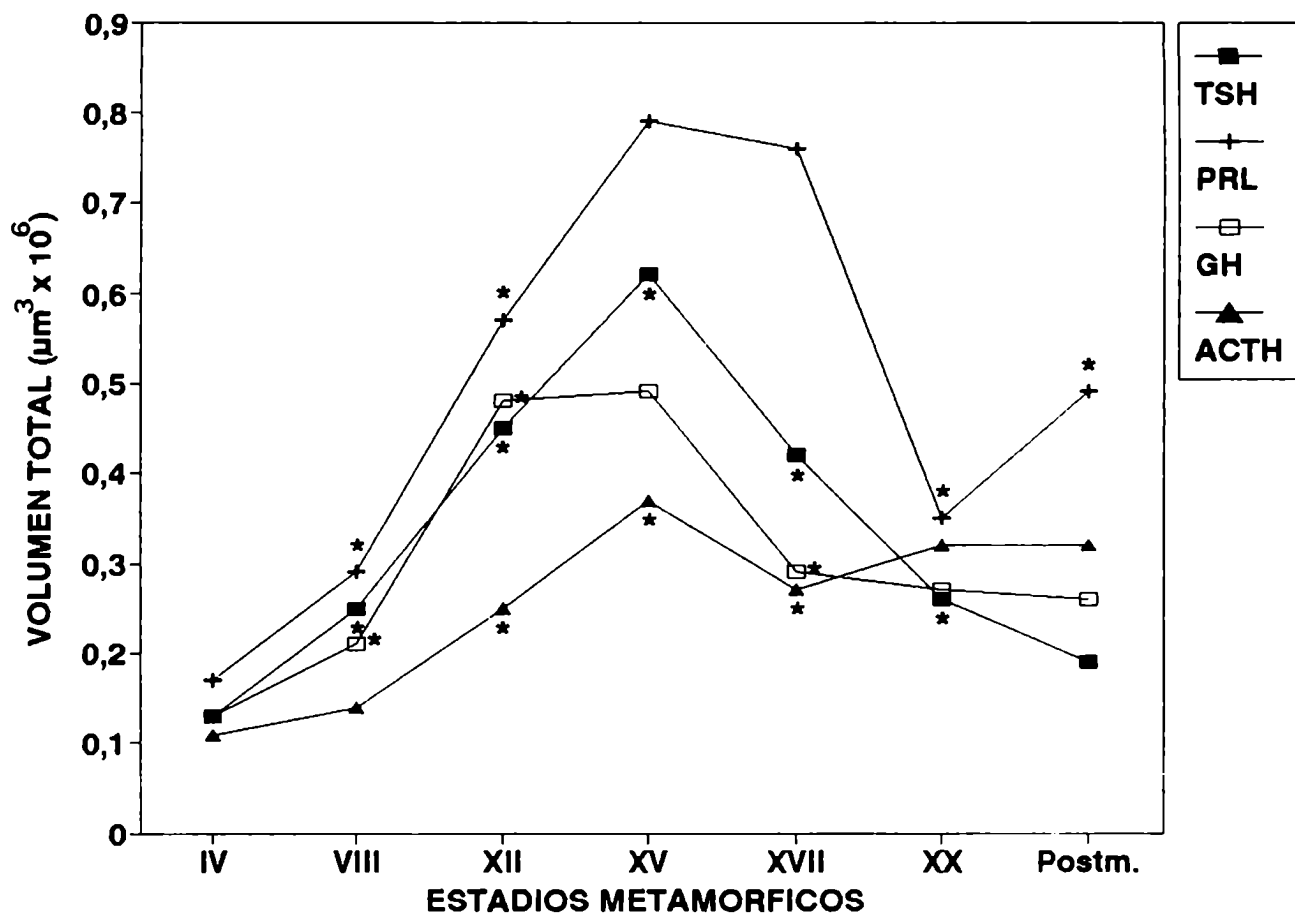


Fig. 18 Volumen total ocupado (V) por las células inmunorreactivas TSH, PRL, GH y ACTH, en la hipófisis de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Se representan valores medios (N=5), *P<0,05 respecto del estadio anterior.

IV.1.3. Morfométricos tiroides.

Evolución anatómica. (Figuras 19, 20)

En la especie estudiada, durante la premetamorfosis, puede observarse macroscopicamente el par de glándulas tiroideas situadas a los costados del esófago, en posición anterior con respecto al corazón y el resto de las vísceras (*Figs. 19a, b*). Poseen forma esférica y coloración oscura debido a la presencia de pigmento. A nivel microscópico en estadios premetamórficos pueden observarse las glándulas ubicadas ventralmente al cartílago hioideo y que ya comienzan a organizarse en folículos con coloide (*Fig. 20a*). A través de la metamorfosis las tiroides toman una forma elipsoidal (se desarrollan hacia los laterales de la larva), y el coloide de los folículos cambia de consistencia desde compacto y poco vacuolado (pre-y mitad de prometamorfosis) (*Figs. 20b, c, d*) a fracturado, menos denso y muy vacuolado (final de la prometamorfosis y clímax metamórfico) (*Figs. 20e, f, g*). En juveniles se observa que los folículos y el coloide toman características similares a las observadas en prometamorfosis (*Fig. 20h*). A mayor aumento puede observarse claramente como el coloide es absorbido por las células que forman el folículo y ocasionalmente pueden encontrarse células parafoliculares (*Fig. 20i*).

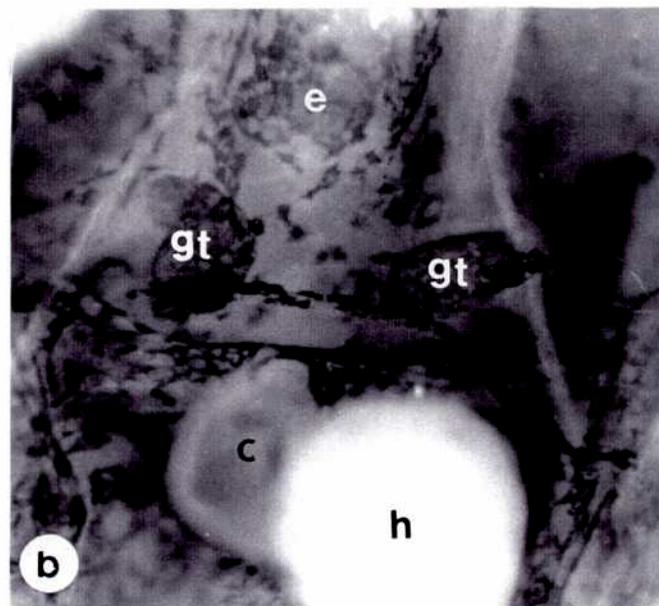
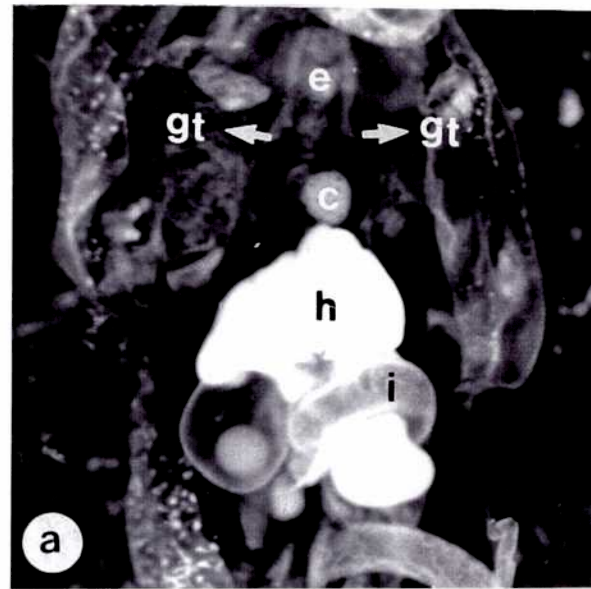


Fig. 19 Observación macroscópica de las glándulas tiroides de larva premetamórfica de *Bufo arenarum*. gt, glándulas tiroides; e, esófago; c, corazón; h, hígado; i, intestino. (a) (5 x), (b) (10 x)

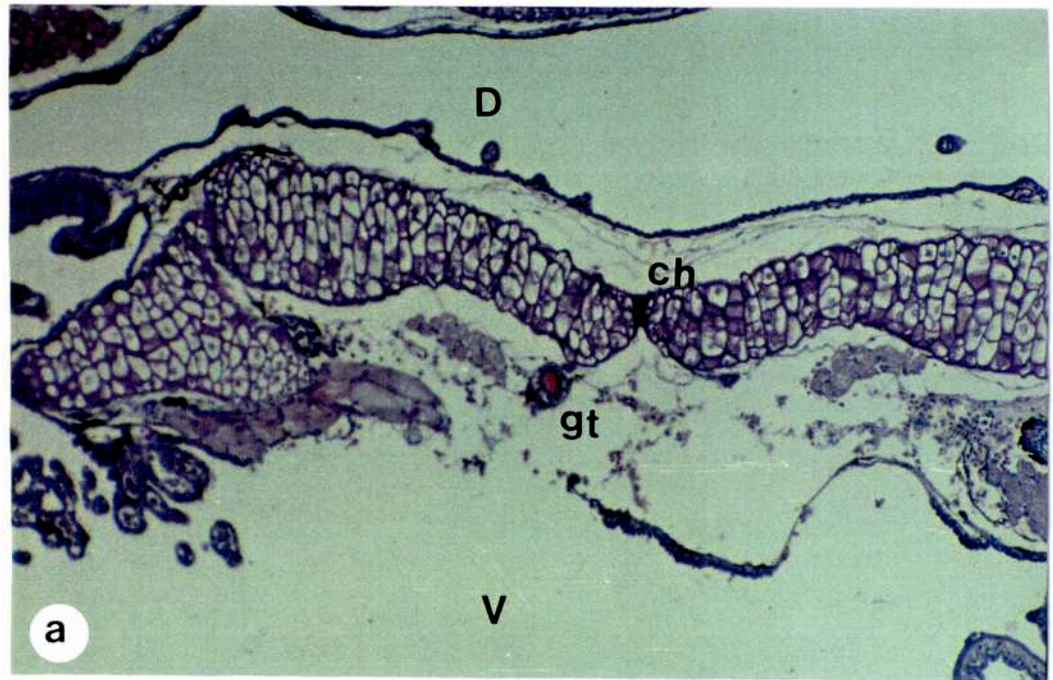


Fig. 20 Evolución anatómica de las glándulas tiroideas de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. (a,b) premetamorfosis (estadio IV), (c) premetamorfosis (estadio VIII), (d,i) prometamorfosis (estadio XII), (e) prometamorfosis (estadio XV), (f) clímax metamórfico (estadio XVII), (g) clímax metamórfico (estadio XX), (h) postmetamorfosis. gt, glándula tiroideas; cf, células foliculares; cpf, células parafooliculares; c, coloide; ch, cartílago hioideo. D dorsal, V ventral. (a) (100 x); (b,c,d,e,f,g,h) (400 x); (i) (1000 x)

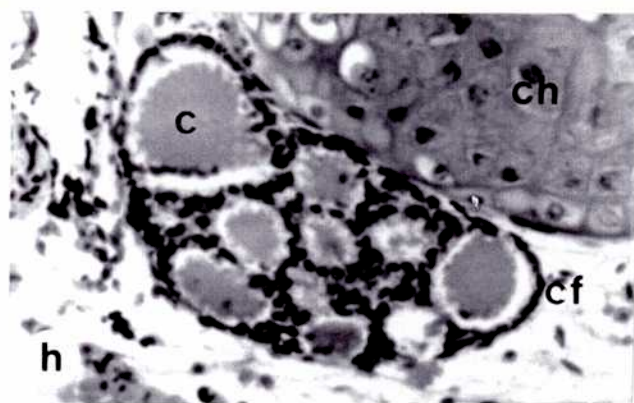
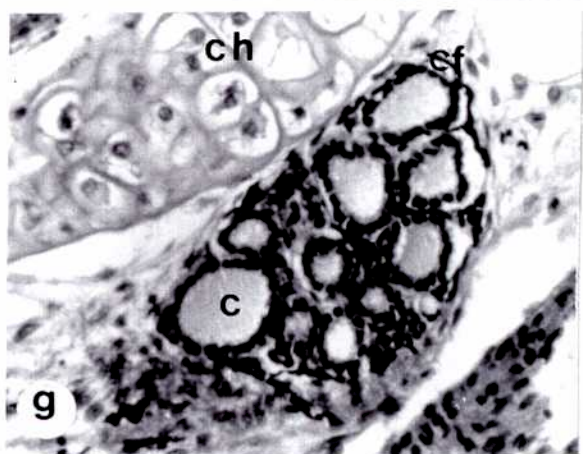
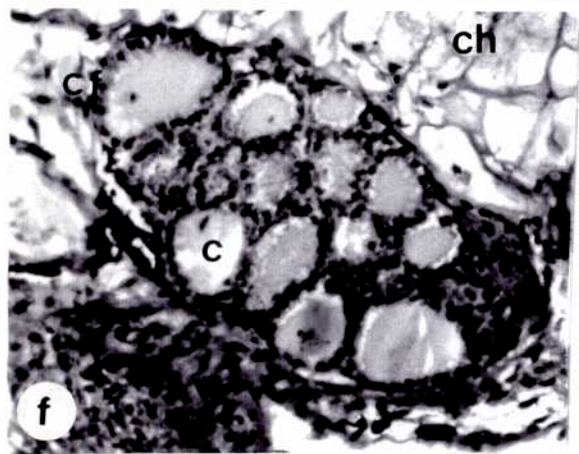
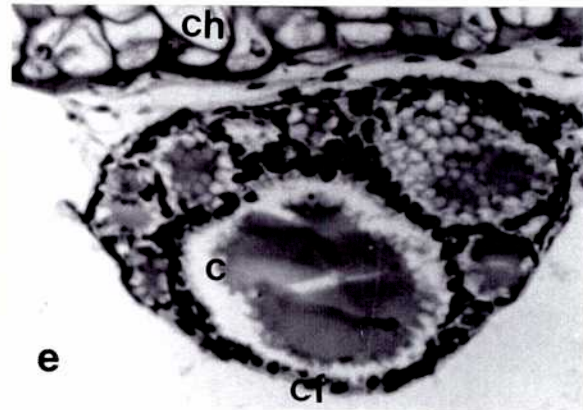
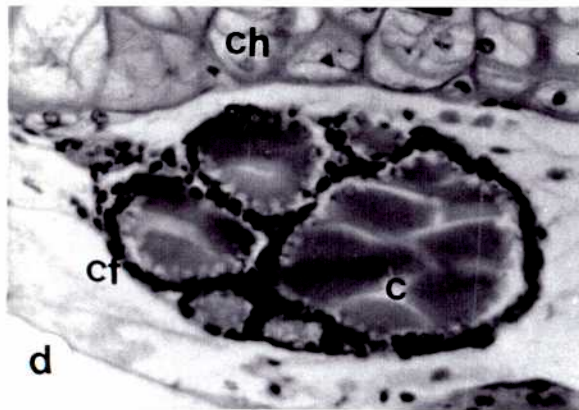
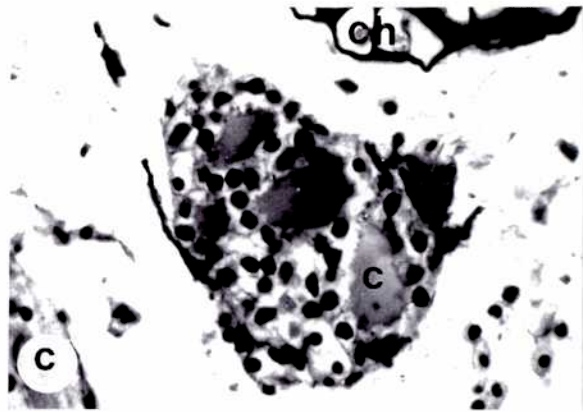
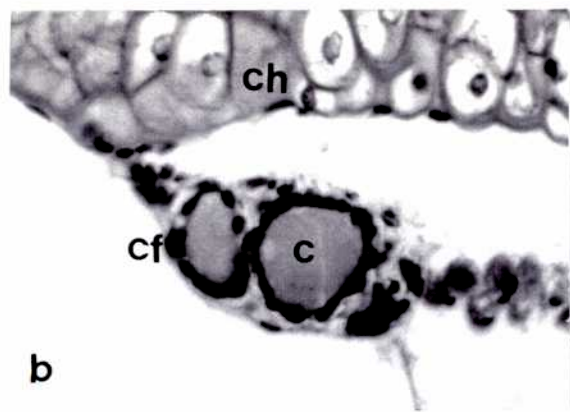


Fig. 20 Continuación.



Fig. 20 Continuación.

Volumen glándulas tiroides (VGT). (Figura 21, Tabla VI)

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

Número de folículos (NF). (Figura 22, Tabla VI)

El NF tiroideos aumentó desde la premetamorfosis hasta la mitad del clímax. Al final del clímax y en animales metamorfoseados este parámetro disminuyó.

Diámetro folicular (DF). (Figura 23, Tabla VI)

El DF aumentó durante el desarrollo, mostrando valores máximos especialmente entre el final de la premetamorfosis y la mitad de la prometamorfosis. Durante el clímax disminuyó y en juveniles volvió a incrementarse.

Altura células foliculares (ACF). (Figura 24, Tabla VI)

Se observó un aumento en la ACF tiroideas durante la pre- y prometamorfosis alcanzando el valor máximo hacia la mitad del clímax metamórfico. Al completar la metamorfosis este parámetro disminuyó drásticamente, obteniéndose valores similares en ejemplares postmetamórficos.

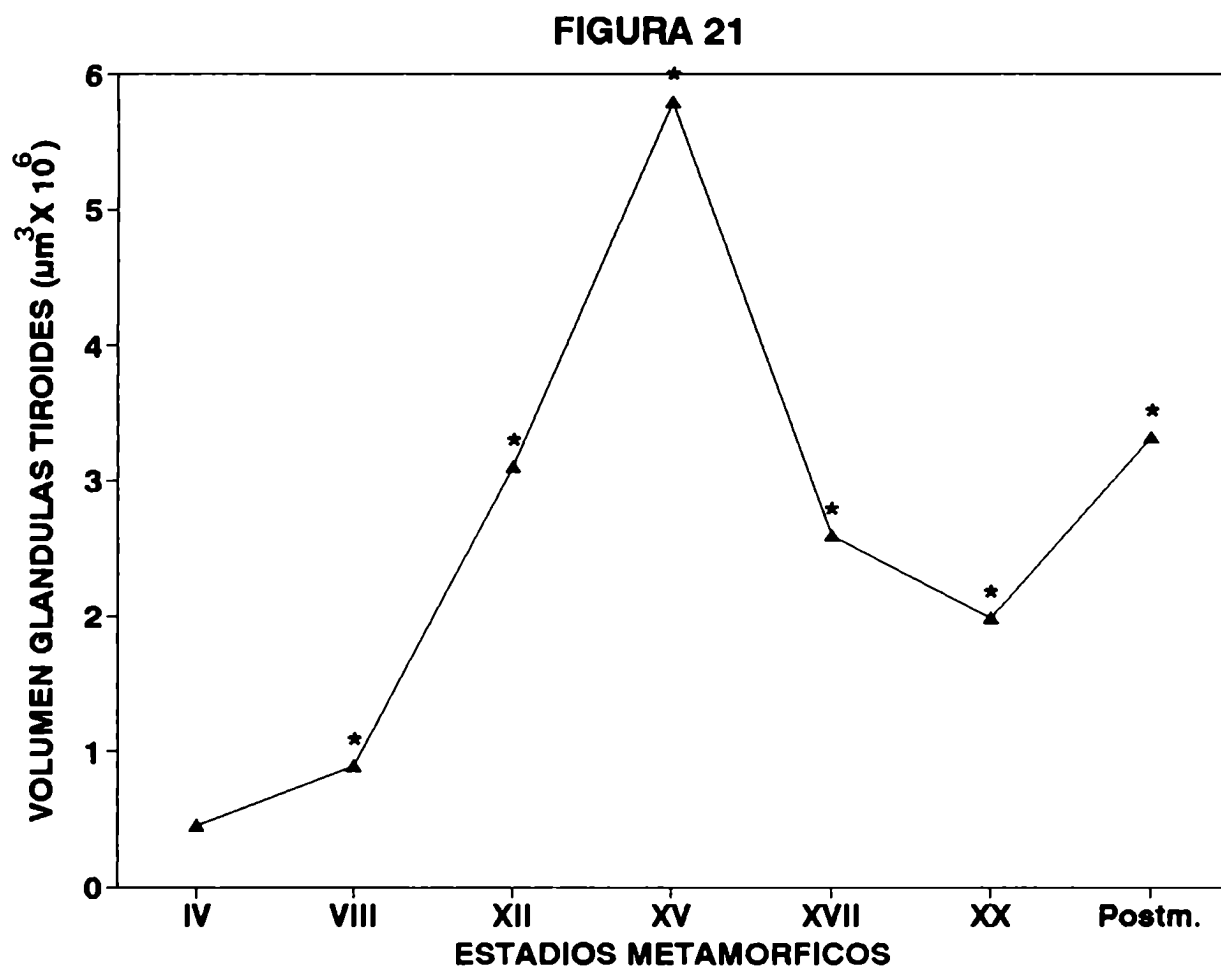


Fig. 21 Volumen de las glándulas tiroides de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Se representan valores medios (N=5), * $P < 0,05$ respecto del estadio anterior.

FIGURA 22

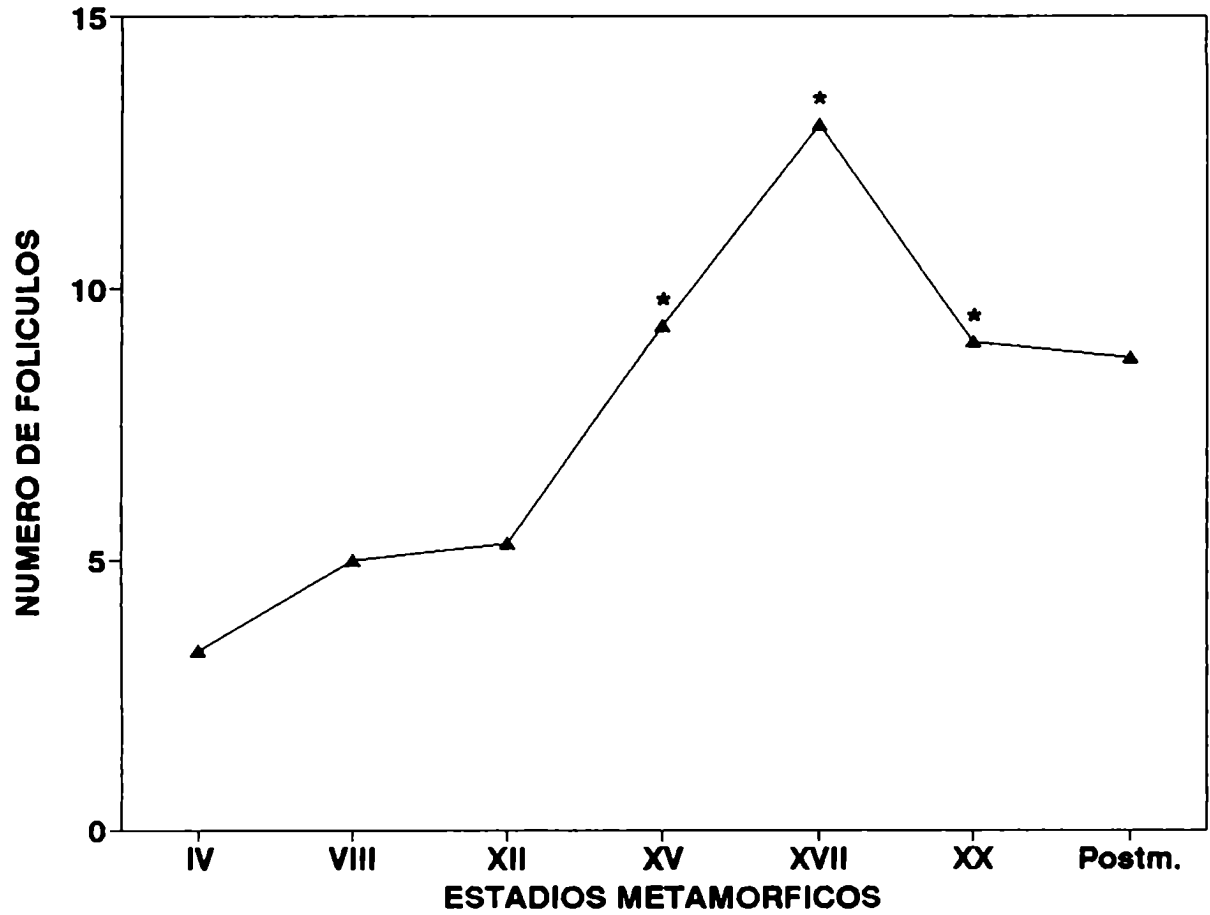


Fig. 22 Número de folículos presentes en las glándulas tiroides de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Se representan valores medios (N=5), *P<0,05 respecto del estadio anterior.

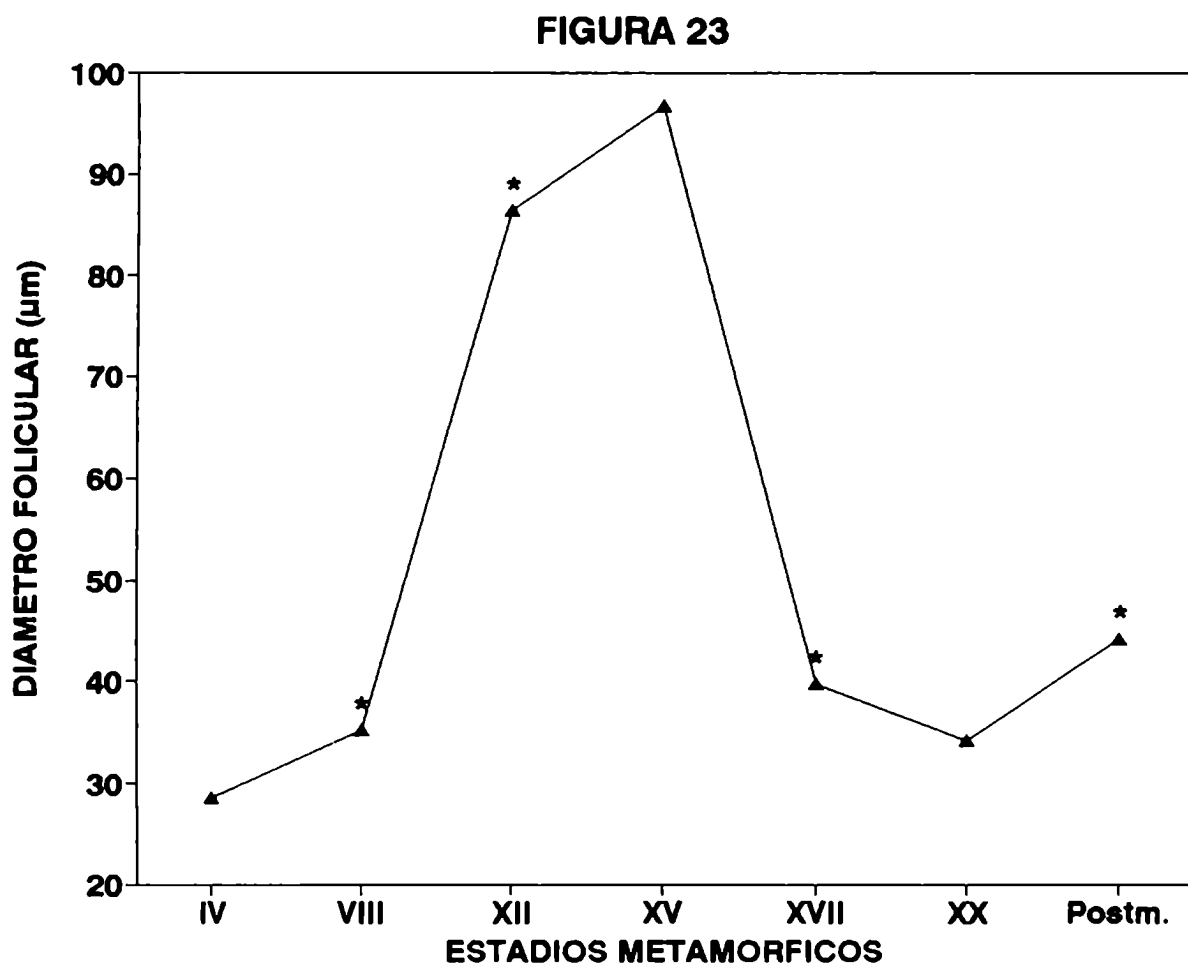


Fig. 23 Diámetro máximo folicular tiroideo de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Se representan valores (N=5), *P<0,05 respecto del estadio anterior.

FIGURA 24

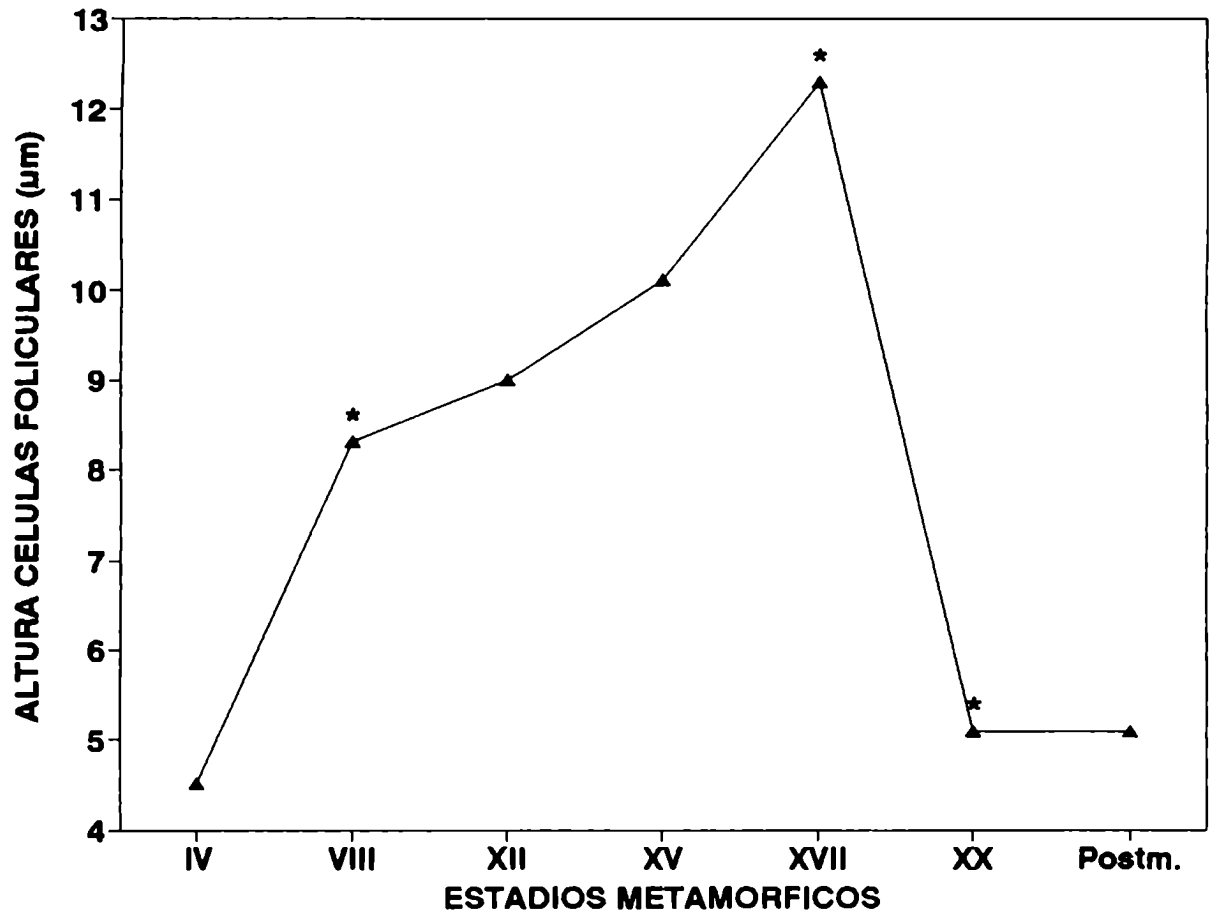


Fig. 24 Altura de las células foliculares tiroideas de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Se representan valores medios (N=5), *P<0,05 respecto del estadio anterior.

IV.1.4. Ultraestructurales tiroides. (Figura 25)

A nivel ultraestructural las células epiteliales foliculares tiroideas de larvas de *Bufo arenarum*, muestran la misma distribución general subcelular de organelas encontradas en la mayoría de las células tiroideas de otros vertebrados. El núcleo se encuentra situado en el centro de las células foliculares, mientras que la mayoría del retículo endoplasmático ocupa una posición infranuclear (basal) y la mayoría de vacuolas, gránulos asociados al aparato de Golgi y mitocondrias, se encuentran en la zona supranuclear (apical). Pueden observarse algunos microvilli en la parte apical celular en contacto con el coloide del folículo. Cabe destacar la presencia de grandes espacios intercelulares (canales) entre las células adyacentes que forman el folículo.

Los cambios observados a nivel óptico en la altura del epitelio folicular tiroideo fueron confirmados a nivel ultraestructural. Durante la premetamorfosis (Fig. 25a) encontramos células bajas cúbicas, con pocas organelas, distribuidas especialmente en la zona apical celular. Hacia la mitad de la prometamorfosis (Fig. 25b), se notan células foliculares bien desarrolladas (cilíndricas bajas), con un aumento en la cantidad de organelas especialmente del RER situado por debajo y a los costados del núcleo. Voluminosas mitocondrias ubicadas tanto en la zona supra- como infranuclear se encuentran en relación con el retículo

endoplasmático y los cambios en su número parecerían estar en proporción directa con la cantidad de retículo presente. El aparato de Golgi siempre se encuentra en la zona supranuclear siendo más extenso, vesiculoso y aparentemente más activo en las células de mayor altura. En el lumen folicular comienzan a notarse signos de vacuolización, indicando principio de reabsorción. Hacia la mitad del clímax (*Figs. 25c, d*), estadios de mayor estimulación tiroidea, se observa el mayor desarrollo de las células foliculares (células cilíndricas altas), con gran cantidad de RER, Golgi y vacuolas intracelulares en la zona supranuclear en el límite con el coloide. Estas vacuolas intracelulares serían vacuolas de coloide rodeadas por numerosos y pequeños citosomas conteniendo lisosomas, que parecerían estar en contacto directo, o fusionados, con las grandes vacuolas de coloide.

Los cambios en el tamaño y el volúmen de las células foliculares se deberían a la cantidad y desarrollo de las organelas celulares que estarían directamente relacionadas con la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas.

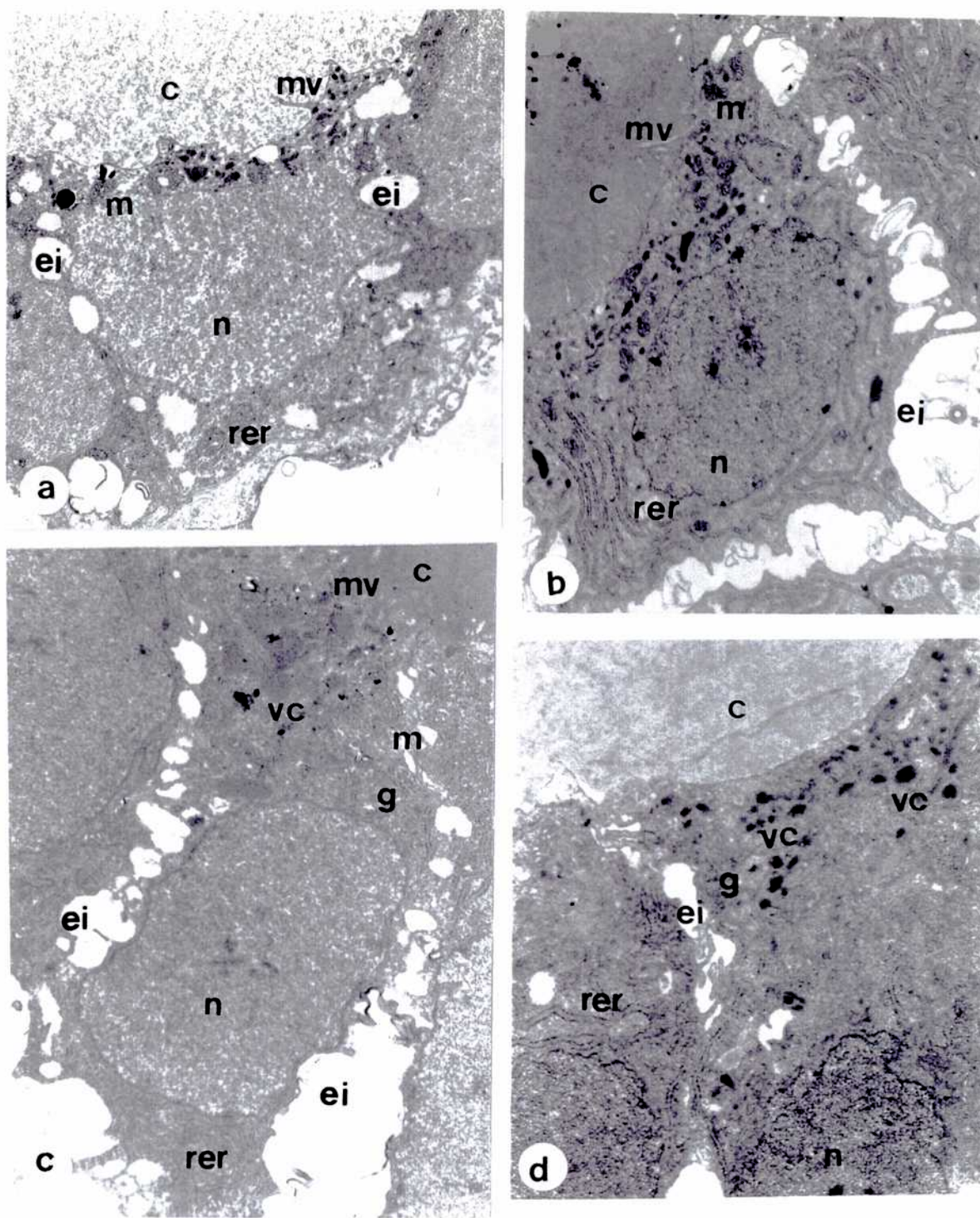


Fig. 25 Célula epitelial folicular tiroidea de larva de *Bufo arenarum*. (a) mitad premetamorfosis, (b) mitad prometamorfosis; (c, d), clímax metamórfico temprano. c, coloide; g, aparato de Golgi; rer, retículo endoplasmático; n, núcleo; ei, espacio intercelular; m, mitocondria; mv, microvilli; vc, vacuola coloide. (a) (2500 x), (b) (3500 x), (c) (3000 x), (d) (6500 x)

IV.2. Efecto del goitrógeno perclorato de potasio en el desarrollo y evolución de la pars distalis hipofisaria y de las glándulas tiroides.

IV.2.1. Morfométricos corporales.

Estadios metamórficos. (Figura 26, Tabla 7)

Las larvas tratadas con el goitrógeno perclorato de potasio con las dos dosis mencionadas, mostraron un notable detenimiento de los procesos metamórficos, con respecto a las larvas control. A partir de la semana 7 de tratamiento se registraron diferencias significativas entre las larvas control y las tratadas. A las 12 semanas todas las larvas control habían superado la metamorfosis mientras las experimentales se encontraban detenidas en estadios de final de premetamorfosis (VIII), estadio que no superaron en los 5 meses de tratamiento. No se encontraron diferencias significativas entre las larvas tratadas con las diferentes dosis del goitrógeno.

Longitud. (Figuras 27, 28 y Tabla 8)

La inhibición en el desarrollo larval causada por el goitrógeno no impidió el crecimiento corporal larval. Después de 12 semanas de tratamiento las larvas alcanzaron una longitud total promedio de aproximadamente 40 mm y a las 20 semanas de 60 mm. Mientras que las larvas controles llegaron a una longitud máxima de 35 mm a las 10 semanas alcanzando los estadios (XIV-XV) de final de la prometamorfosis. Se

FIGURA 26

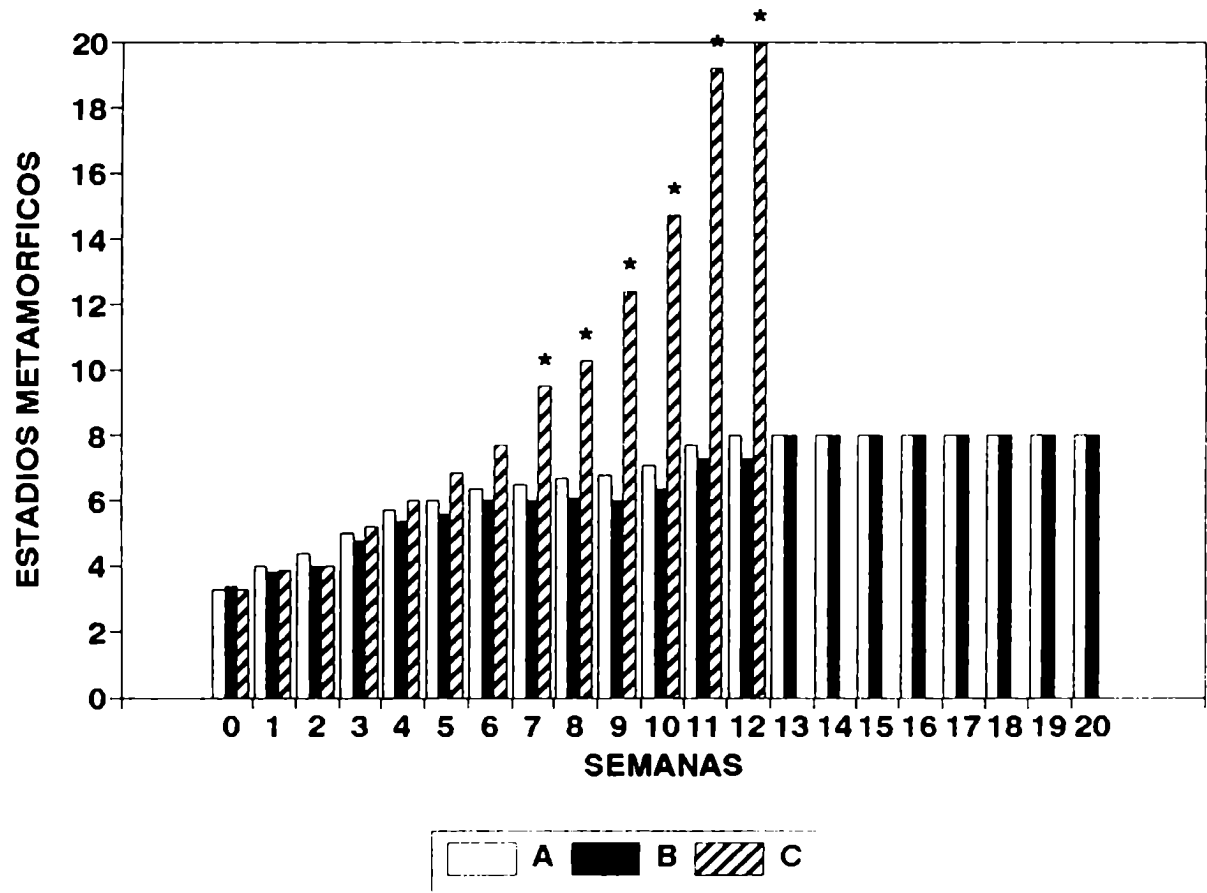


Fig. 26 Estadios metamórficos de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO_4 . A: 0,034 % B: 0,051 % C: CONTROL. Se representan valores medios semanales (N=15), *P<0,05 diferencias significativas entre grupos.

FIGURA 27

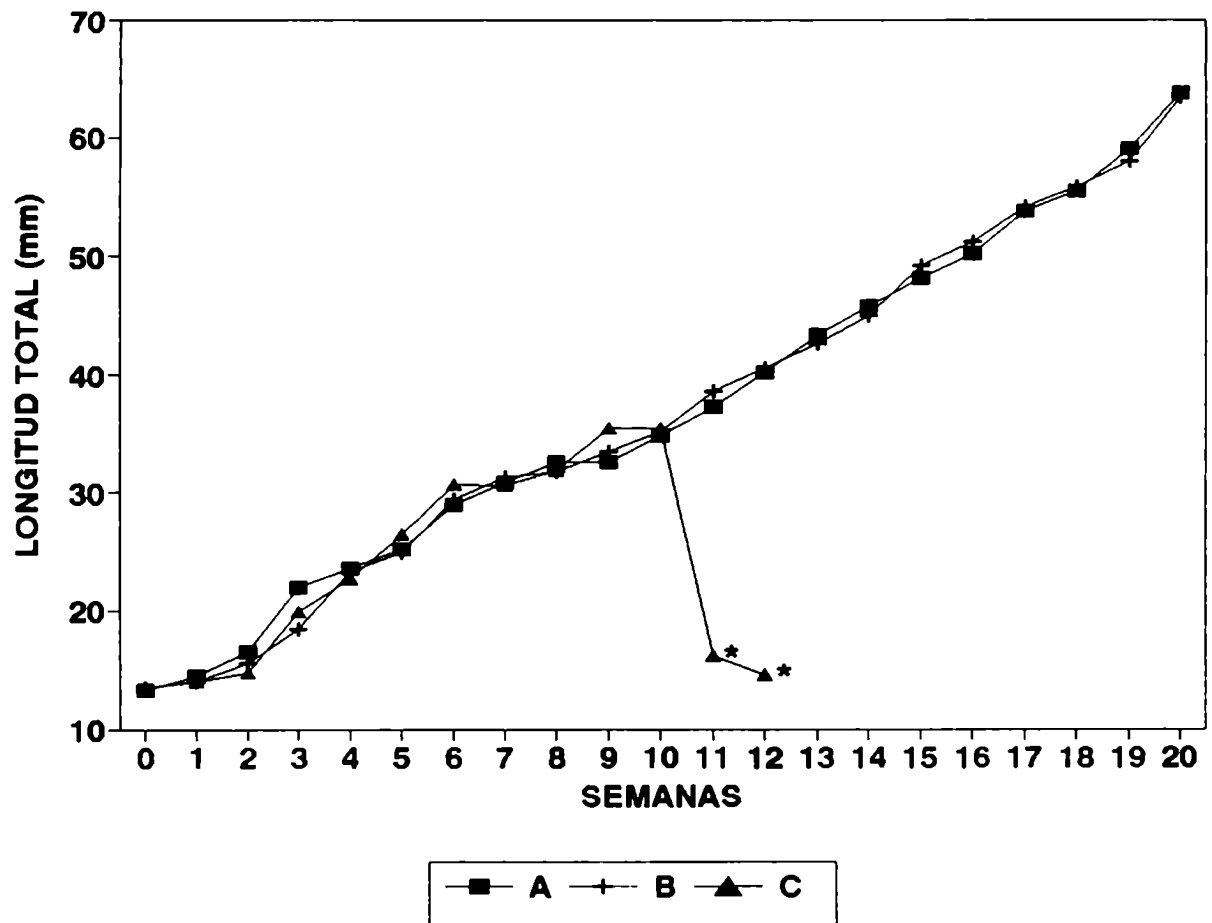


Fig. 27 Longitud total de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO_4 , A: 0,034 % B: 0,051 % C: CONTROL. Se representan valores medios semanales (N=15), *P<0,05 diferencias significativas entre grupos.

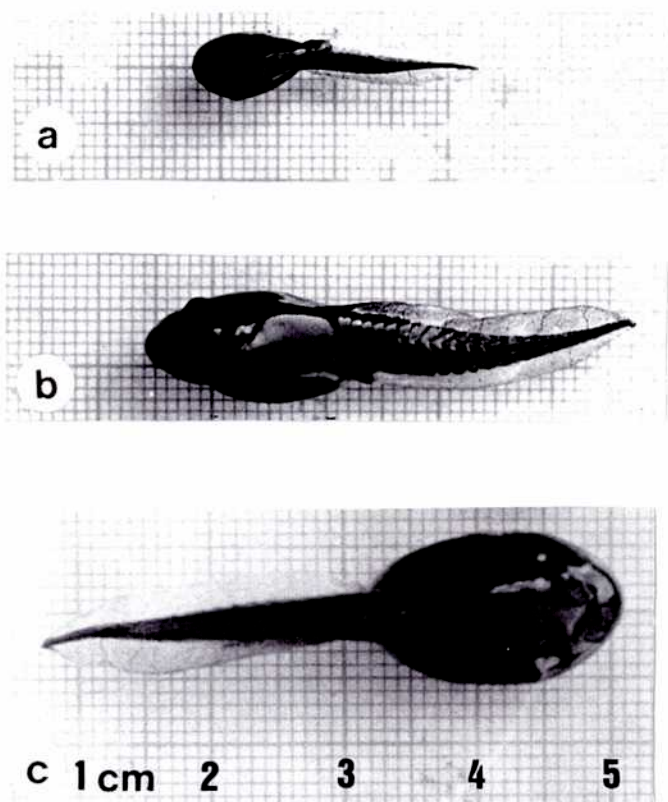


Fig. 28 Larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO_4 (0,034 %) durante 3 y 5 meses. (a) larva control en estadio VIII, (b) 3 meses, (c) 5 meses. (a,b,c) (1,5 x)

observó un mayor crecimiento en longitud de las larvas tratadas con respecto a las controles, registrándose diferencias significativas a partir de la semana 11 de tratamiento. No se encontraron diferencias significativas entre las larvas tratadas con las diferentes dosis del goitrógeno.

Peso total húmedo (P). (Figura 29, Tabla 9)

Este parámetro al igual que la longitud total, aumentó a lo largo del tratamiento. A los 3 meses se registraron valores promedios cercanos a 1 g y a los 5 meses cercanos a 1,15 g, mientras que las larvas controles nunca superaron los 0,4 g. Se registraron diferencias significativas entre larvas controles y tratadas a partir de la semana 8 de tratamiento. No se encontraron diferencias significativas entre las larvas tratadas con las diferentes dosis del goitrógeno.

IV.2.2. Immunocitoquímicos y morfométricos pars distalis.

Evolución anatómica pars distalis. (Figuras 30, 31)

En las larvas tratadas se observaron voluminosas hipófisis hiperplásicas, mostrando especialmente un crecimiento mayor de la pars distalis (Figs. 30a, b). Sin embargo no se observaron características diferentes a las encontradas en larvas premetamórficas normales, no observándose un mayor desarrollo de la eminencia media ni de la pars nervosa. Con la coloración de Mallory se observó una mayor tinción de

FIGURA 29

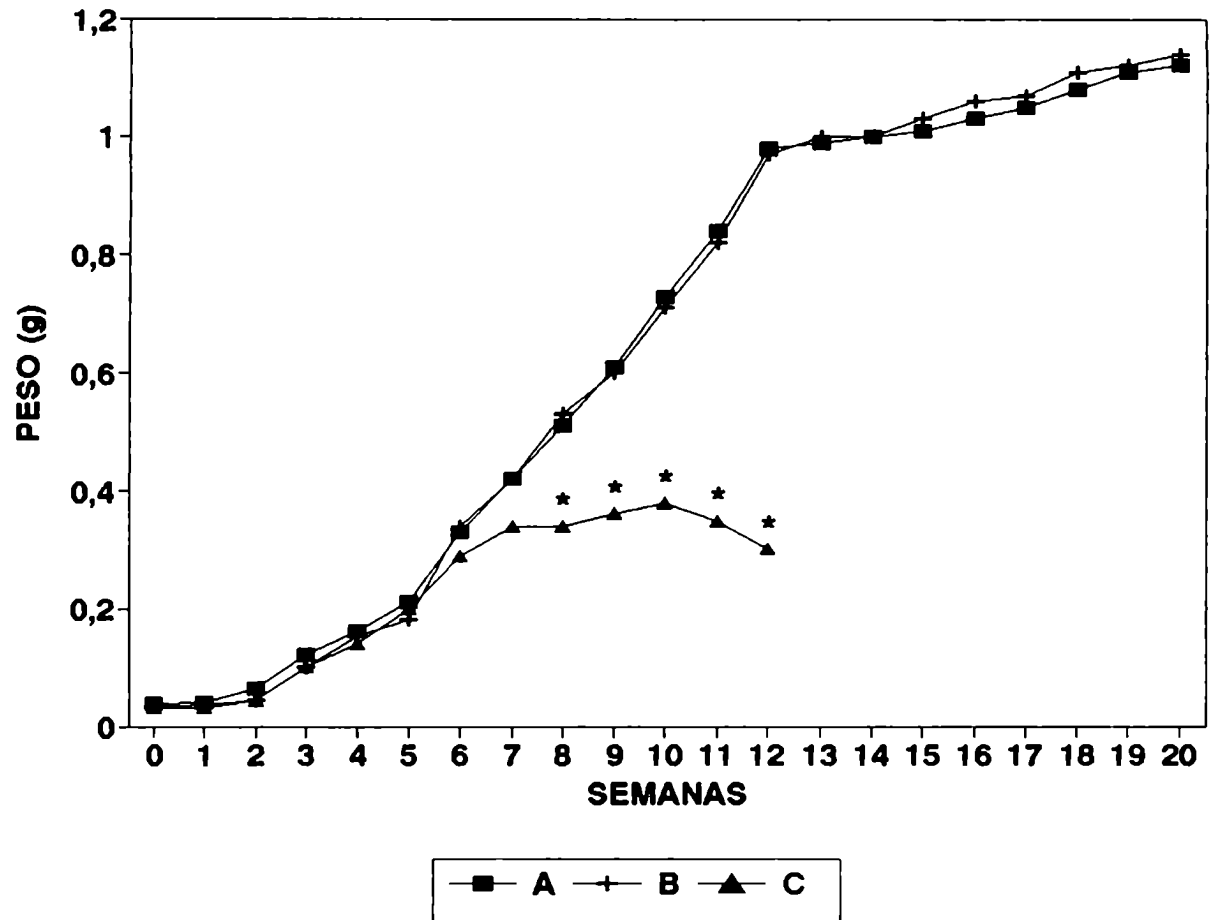


Fig. 29 Peso húmedo de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO_4 , A: 0,034 % B: 0,051 % C: CONTROL. Se representan valores medios semanales (N=15), * $P < 0,05$ diferencias significativas entre grupos.

células acidófilas (color rojo intenso) especialmente en la zona caudal de la pars distalis tanto a los 3 como a los 5 meses de tratamiento (*Figs. 31a, b*) cuando comparadas con las controles (*Fig. 31c*).

Volumen de la pars distalis (VPD). (Figura 32, Tabla 10)

En las larvas experimentales se observó un drástico incremento de este parámetro, registrándose valores a los 3 meses que cuadruplicaban y a los 5 meses septuplicaban los valores obtenidos en las larvas control.

Distribución células inmunorreactivas.

Por medio de técnicas inmunocitoquímicas fueron identificadas células TSH, PRL, GH y ACTH en la pars distalis de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en KClO₄ durante 3 y 5 meses, como así también en larvas controles en el mismo estadio que las tratadas. No se obtuvo inmunorreacción cuando los anticuerpos primarios fueron sustituidos por PBS o cuando se incubó con los anticuerpos primarios previamente preabsorbidos con antígenos homólogos.

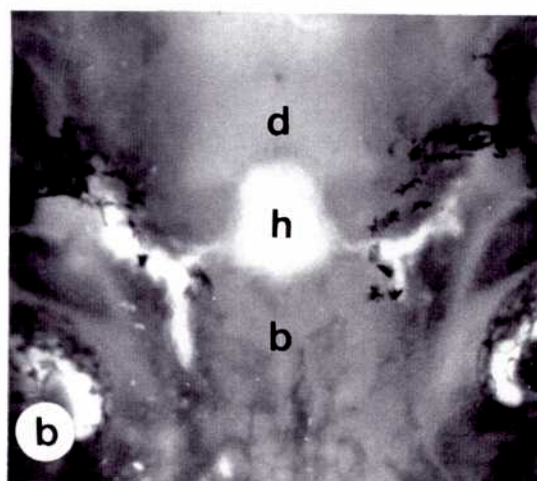
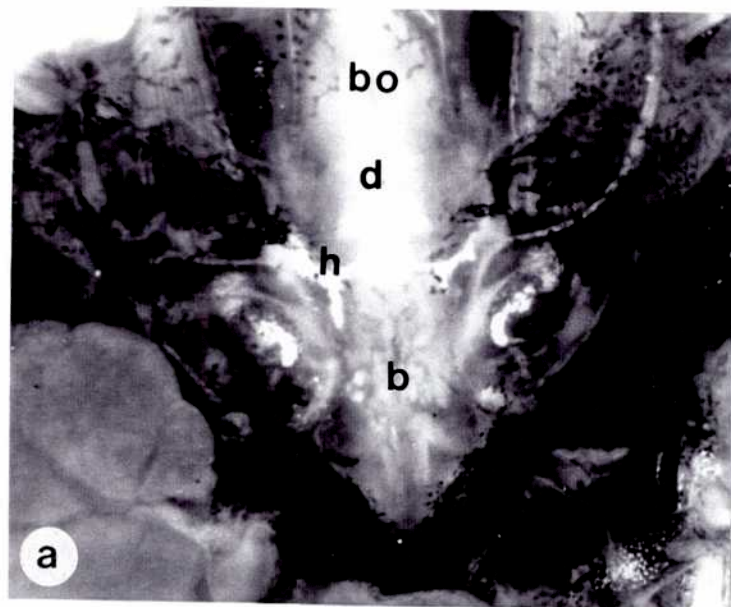


Fig. 30 Observación macroscópica de la hipófisis de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO_4 (0,034 %) durante 3 meses. bo, bulbo olfatorio; d, diencéfalo; h, hipófisis; b, bulbo. (a) (5 x), (b) (10 x)

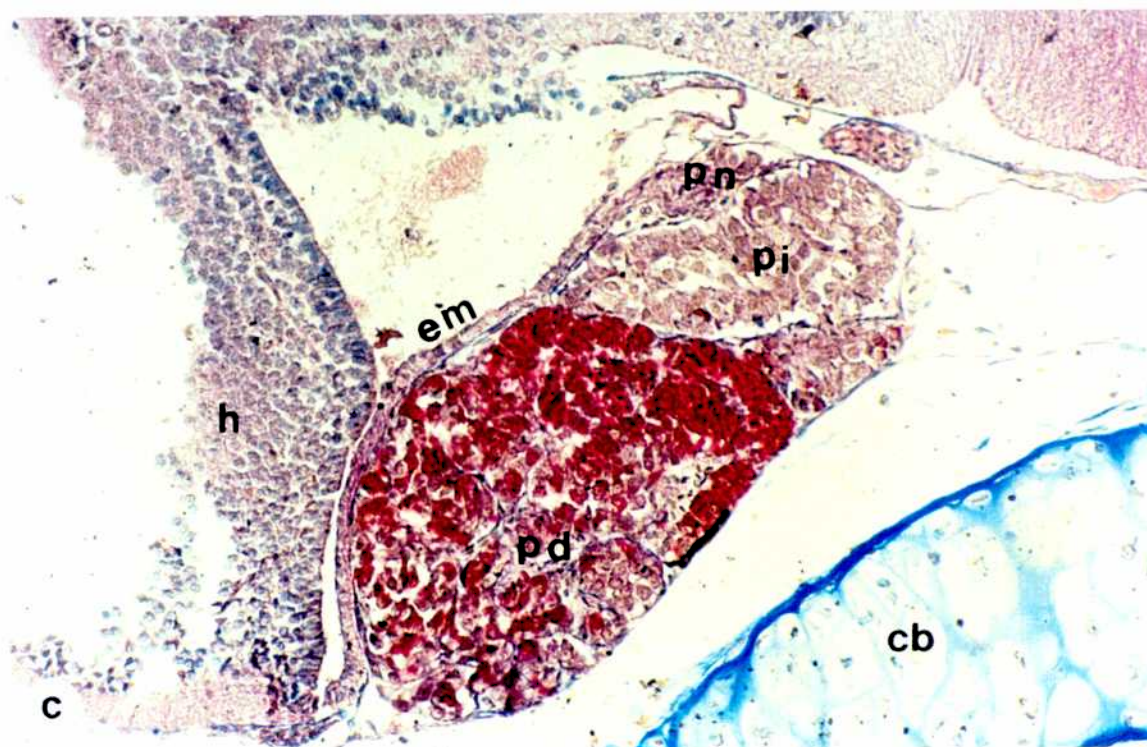
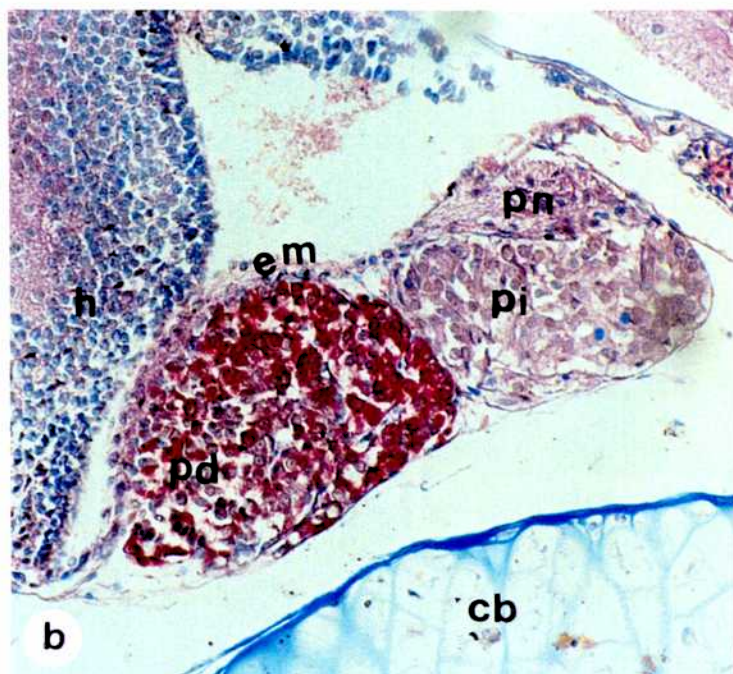


Fig. 31 Evolución anatómica de la hipófisis de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO_4 (0,034 %) durante 3 y 5 meses. (a) larva control en estadio VIII, (b) 3 meses, (c) 5 meses. pn, pars nervosa; pi, pars intermedia; pd, pars distalis; em, eminencia media; h, hipotálamo; cb, cartílago basiesfenoides. (a,b,c) (400 x)

FIGURA 32

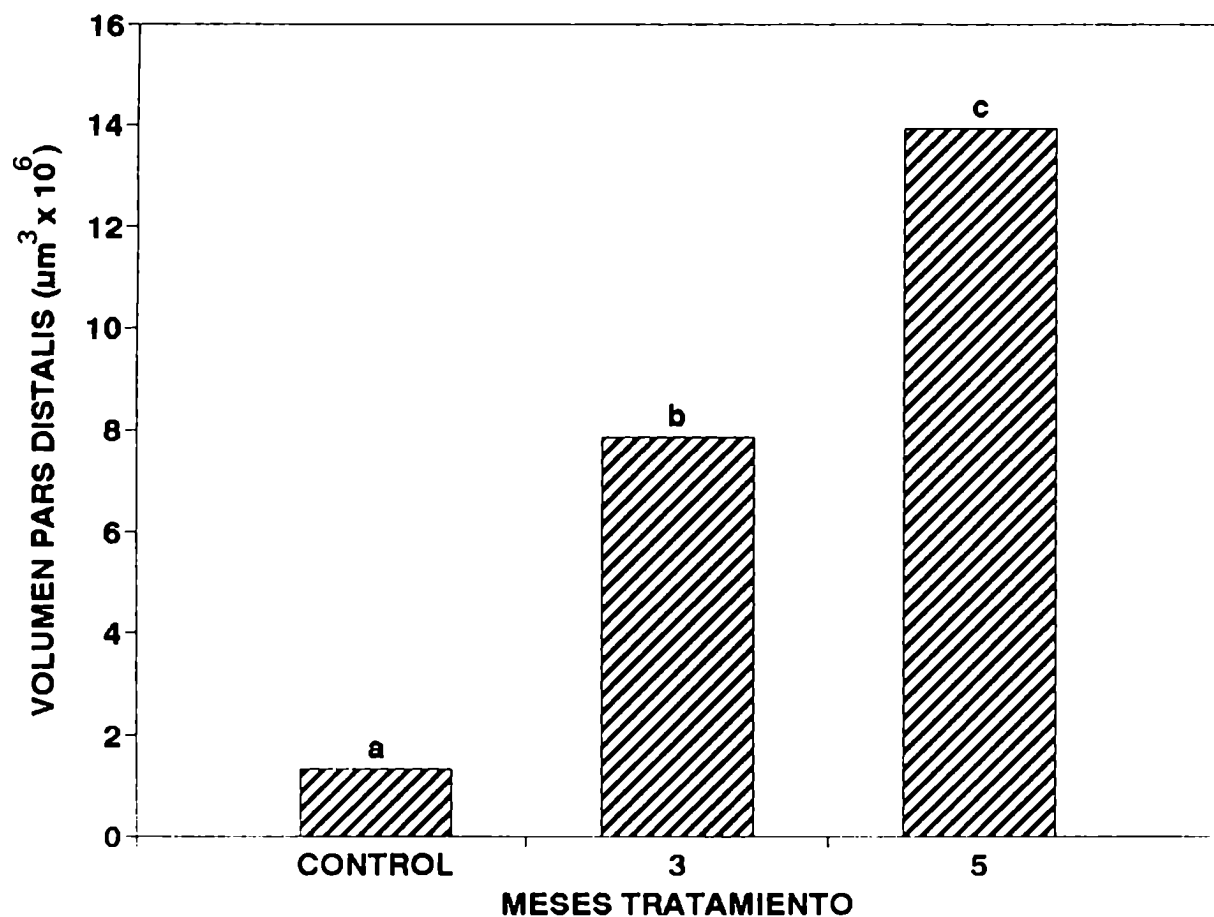


Fig. 32 Volumen de la pars distalis de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO₄ (0,034 %) durante 3 y 5 meses. Los valores identificados con la misma letra no difieren significativamente, $P < 0,05$. Se representan valores medios (N=5).

Células TSH. (Figura 33)

En las larvas controles las células inmunorreactivas fueron encontradas en la zona centro-ventral de la pars distalis (*Fig. 33a*). En las tratadas se distribuyeron en toda la glándula y la inmurreacción obtenida fué menos intensa (*Figs. 33b, c, d*).

Células PRL. (Figura 34)

En las larvas no tratadas, esta clase celular se distribuyó por toda la glándula a excepción de la zona caudal (*Fig. 34a*), pero en las tratadas cambió la distribución ocupando principalmente el área dorsal de la pars distalis a los 3 meses de tratamiento (*Fig. 34b*) y el área dorsal y en menor proporción el área central glandular a los 5 meses de tratamiento (*Figs. 34c, d*).

Células GH. (Figura 35)

Este tipo celular se identificó en larvas normales en la zona caudal y en menor medida hacia la zona central de la pars distalis (*Fig. 35a*) y unicamente en la zona caudal de la glándula (especialmente en la zona de contacto con la pars intermedia) en las larvas tratadas (*Fig. 35b, c, d*).

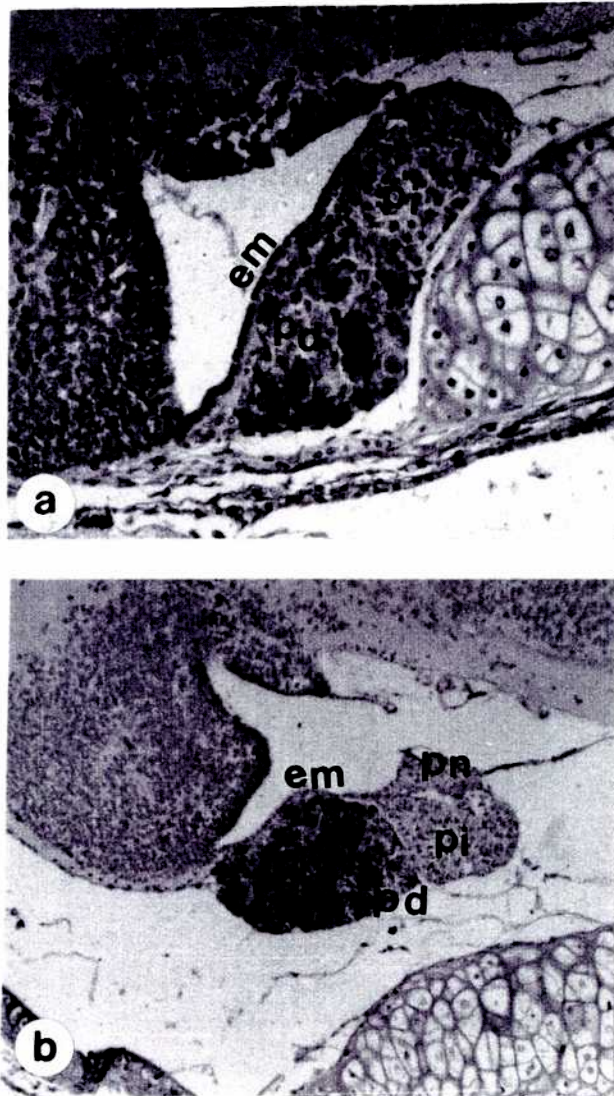


Fig. 33 Cortes mediosagitales de hipófisis de *Bufo arenarum* mostrando células TSH inmunorreactivas. Rostral hacia la izquierda. (a) larva control en estadio VIII. (b) larva mantenida durante 3 meses en $KClO_4$. (c,d) larva mantenida durante 5 meses en $KClO_4$. pd, pars distalis; pi, pars intermedia; pn, pars nervosa; em, eminencia media. (a) (250 x), (b) (100 x), (c) (400 x), (d) (525 x)

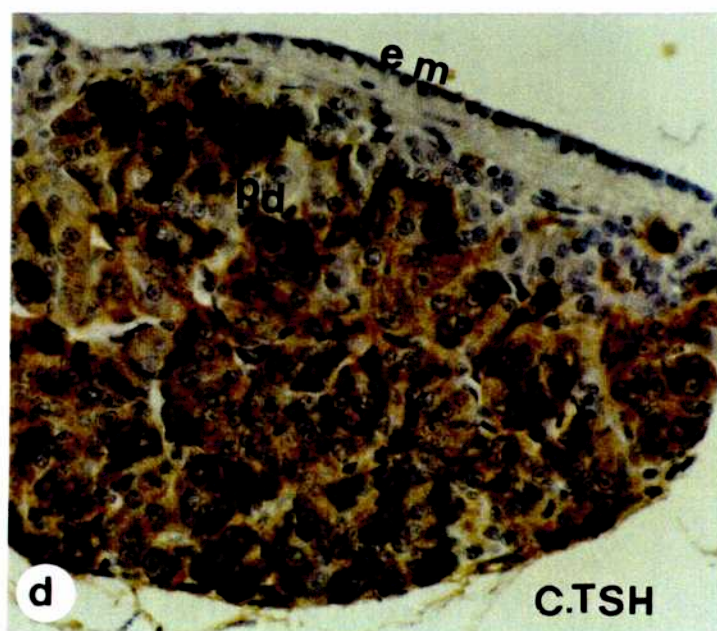


Fig. 33 Continuación.

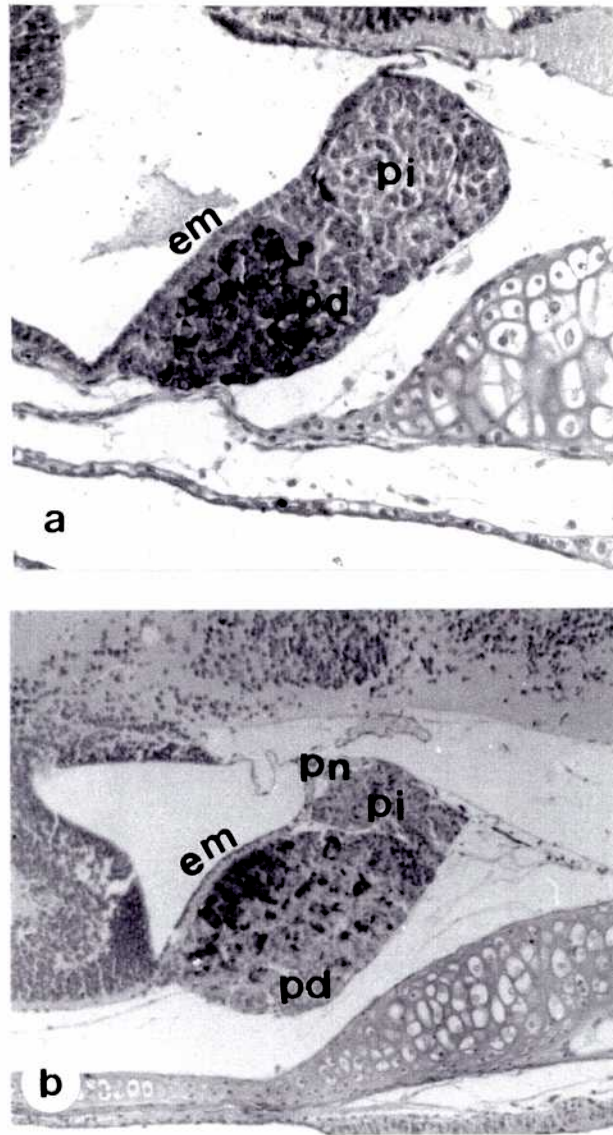


Fig. 34 Cortes mediosagitales de hipófisis de *Bufo arenarum* mostrando células PRL inmunorreactivas. Rostral a la izquierda. (a) larva control en estadio VIII. (b) larva mantenida durante 3 meses en $KClO_4$. (c,d) larva mantenida durante 5 meses en $KClO_4$. pd, pars distalis; pi, pars intermedia; pn, pars nervosa; em, eminencia media. (a) (250 x), (b) (100 x), (c) (400 x), (d) (525 x)

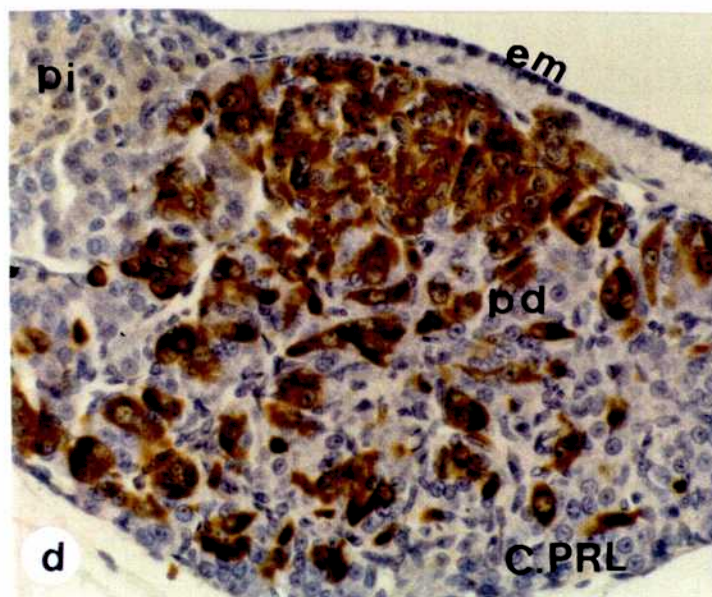


Fig. 34 Continuación.

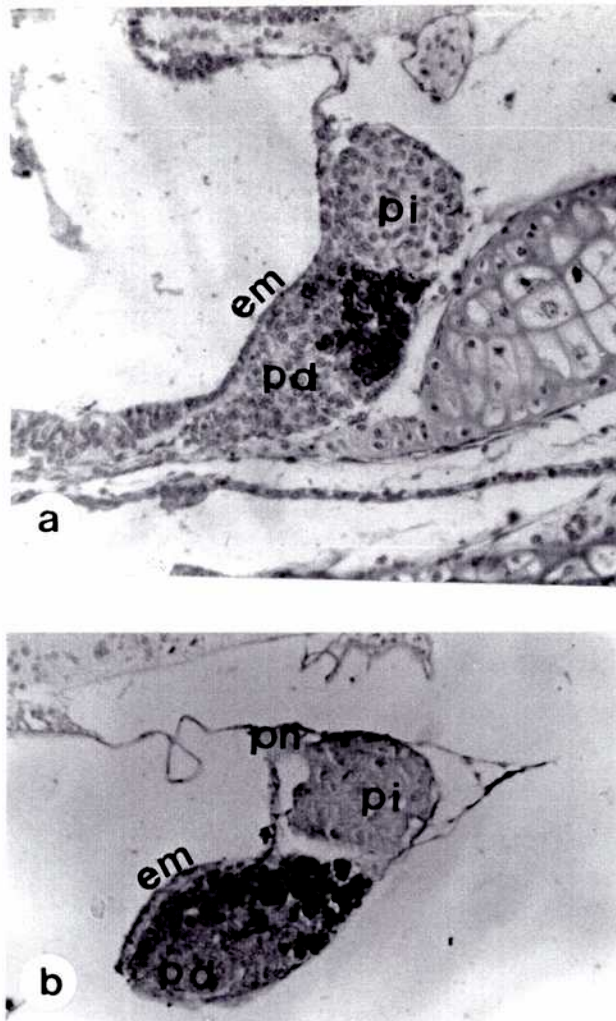


Fig. 35 Cortes mediosagitales de hipófisis de *Bufo arenarum* mostrando células GH inmunorreactivas. Rostral a la izquierda. (a) larva control en estadio VIII. (b) larva mantenida durante 3 meses en KClO₄. (c,d) larva mantenida durante 5 meses en KClO₄. pd, pars distalis; pi, pars intermedia; pn, pars nervosa; em, eminencia media. (a) (250 x), (b) (100 x), (c) (400 x), (d) (525 x)

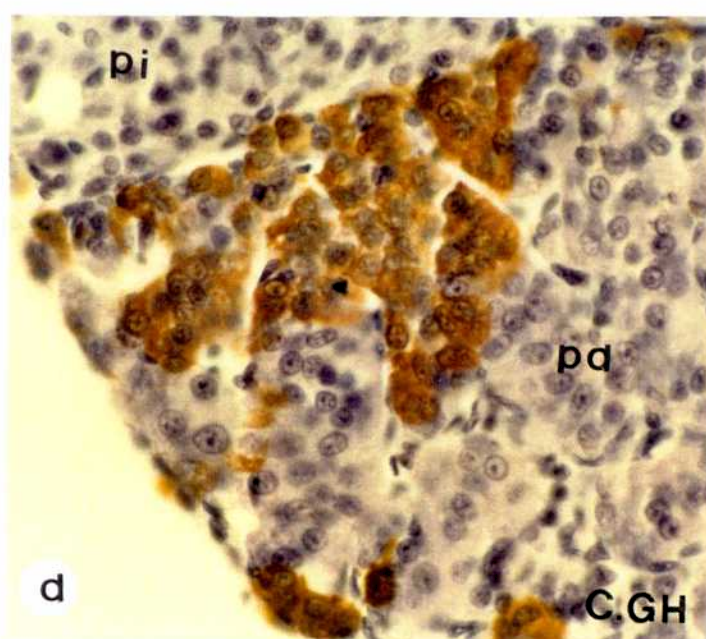
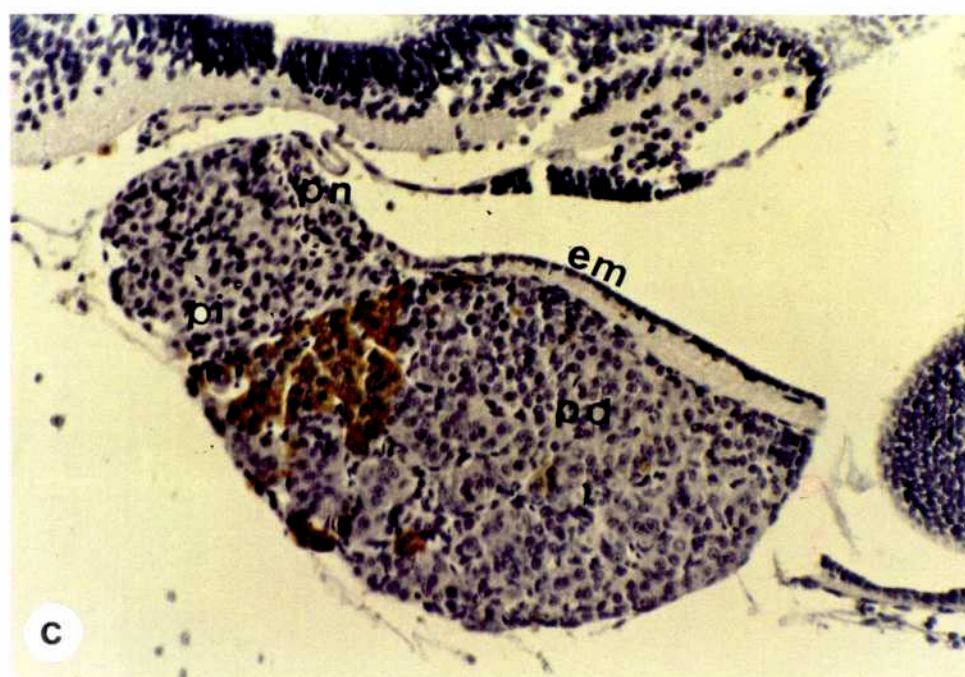


Fig. 35 Continuación.

Células ACTH. (Figura 36)

Estas células aparecieron en escaso número distribuidas en la región rostral o anterior del lóbulo distal en larvas normales (*Fig. 36a*). Mientras que en las experimentales se localizaron en la zona dorsal, principalmente debajo de la eminencia media (*Figs. 36b, c, d*). Es importante mencionar que las células de la pars intermedia exhibieron inmunoreacción al anticuerpo primario utilizado.

Número de células inmunorreactivas. (Figura 37, Tabla 11)

El número de células TSH, PRL, GH y ACTH inmunorreactivas se incrementó en las larvas tratadas y estas diferencias fueron más pronunciadas en las poblaciones de células TSH y PRL. El incremento en el número de células ACTH no fué muy evidente y no se encontraron diferencias significativas entre 3 y 5 meses de tratamiento.

Densidad de volumen (Vv). (Figura 38, Tabla 12)

Este parámetro mostró diferentes patrones en las células estudiadas. Para células TSH y PRL un marcado aumento se observó entre las larvas tratadas durante 5 meses y las controles o las larvas tratadas durante 3 meses. En las células GH una significativa disminución en la Vv se observó entre larvas controles y 5 meses de tratamiento. En las células ACTH no se observaron cambios.

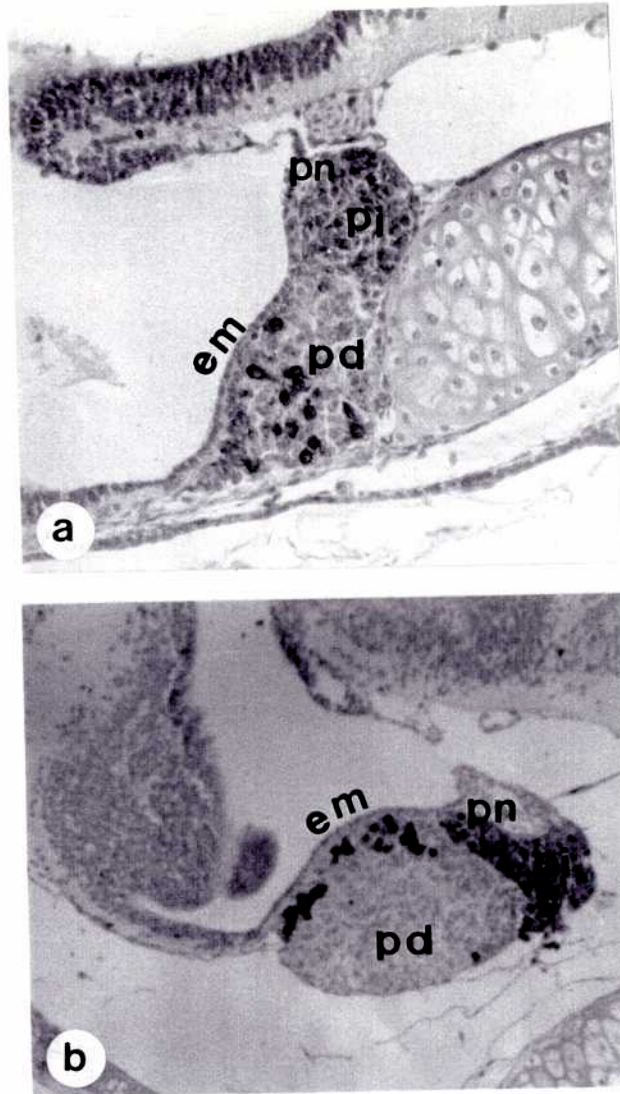


Fig. 36 Cortes mediosagitales de hipófisis de *Bufo arenarum* mostrando células ACTH inmunorreactivas. Rostral a la izquierda. (a) larva control en estadio VIII. (b) larva mantenida durante 3 meses en KClO₄. (c,d) larva mantenida durante 5 meses en KClO₄. pd, pars distalis; pi, pars intermedia; pn, pars nervosa; em, eminencia media. (a) (250 x), (b) (100 x), (c) (400 x), (d) (525 x)

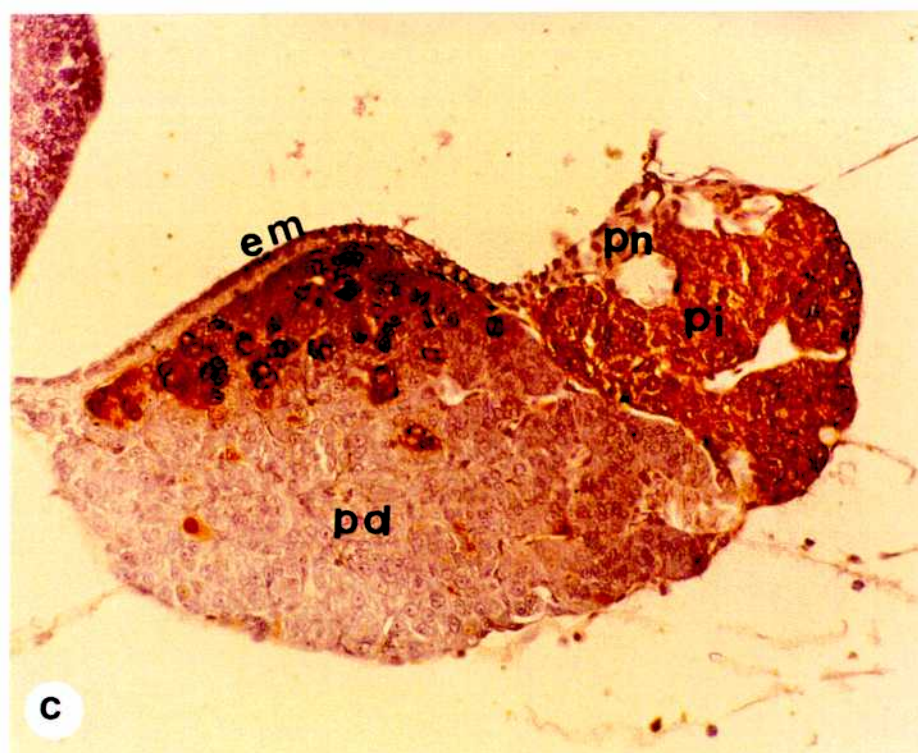


Fig. 36 Continuación.

FIGURA 37

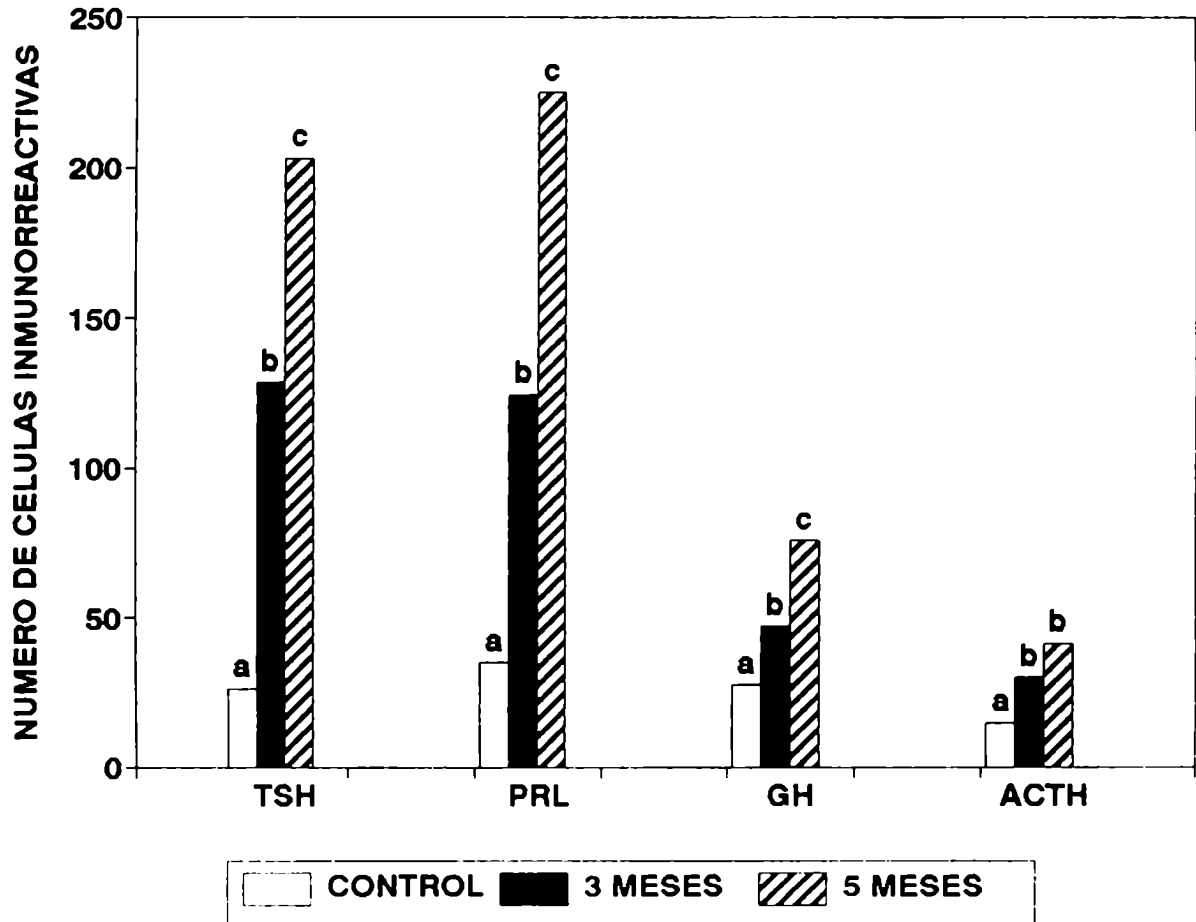


Fig. 37 Número de células inmunorreactivas TSH, PRL, GH y ACTH en la hipófisis de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO₄ (0.034 %) durante 3 y 5 meses. Para cada tipo celular los valores identificados con la misma letra no difieren significativamente, $P < 0,05$. Se representan valores medios (N=5).

FIGURA 38

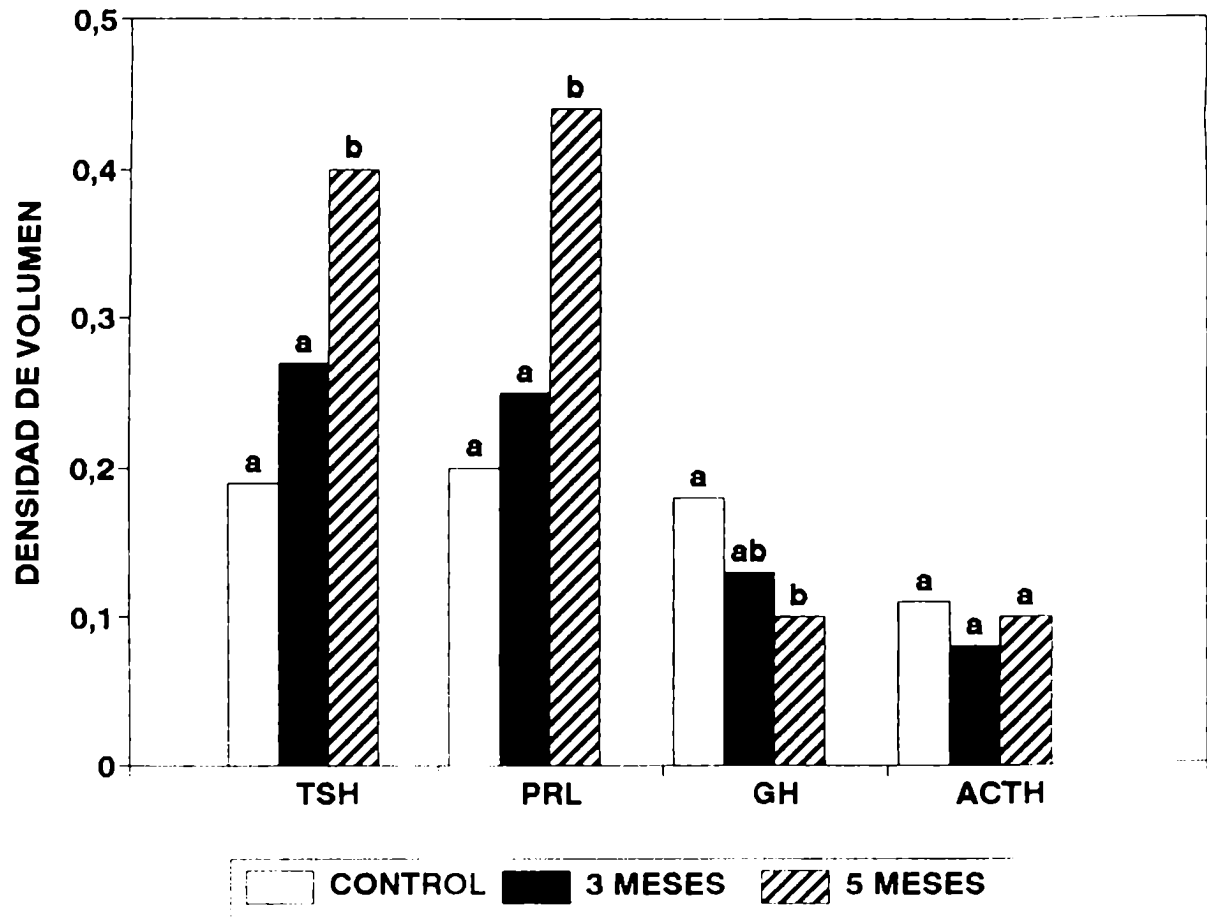


Fig. 38 Densidad de volumen (Vv) de las células inmunorreactivas TSH, PRL, GH y ACTH de la hipófisis de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO_4 (0,034 %) durante 3 y 5 meses. Para cada tipo celular los valores identificados con la misma letra no difieren significativamente. $P < 0,05$. Se representan valores medios (N=5)

Volumen total ocupado (V). (Figura 39, Tabla 13)

El V por células TSH, PRL, GH y ACTH evidenció un considerable incremento entre larvas experimentales y controles. El incremento observado en este parámetro fué extremadamente significativo para células TSH y PRL en larvas tratadas durante 5 meses con respecto a las controles o a las tratadas durante 3 meses.

IV.2.3. Morfométricos tiroides.

Evolución anatómica. (Figura 40)

Las larvas tratadas mostraron tiroides hipertrofiadas, contactando prácticamente con el corazón y a los costados con las branquias, presentando una forma esférica-oval y menor cantidad de pigmento que las larvas premetamórficas normales (*Figs. 40a, b*). El análisis histológico de las tiroides de larvas controles en el mismo estadio en el que se encontraban las experimentales (estadio VIII) mostraron uno o dos folículos con coloide y algunos signos de reabsorción de coloide. Señales de una incipiente actividad glandular (*Fig. 41a*). Mientras que las tiroides de larvas tratadas se mostraron hiperplásicas con células hipertróficas con folículos desorganizados, presentando escasísimo coloide, patrón considerado como de hipofuncionalidad glandular (*Figs. 41b, c, d, e*).

FIGURA 39

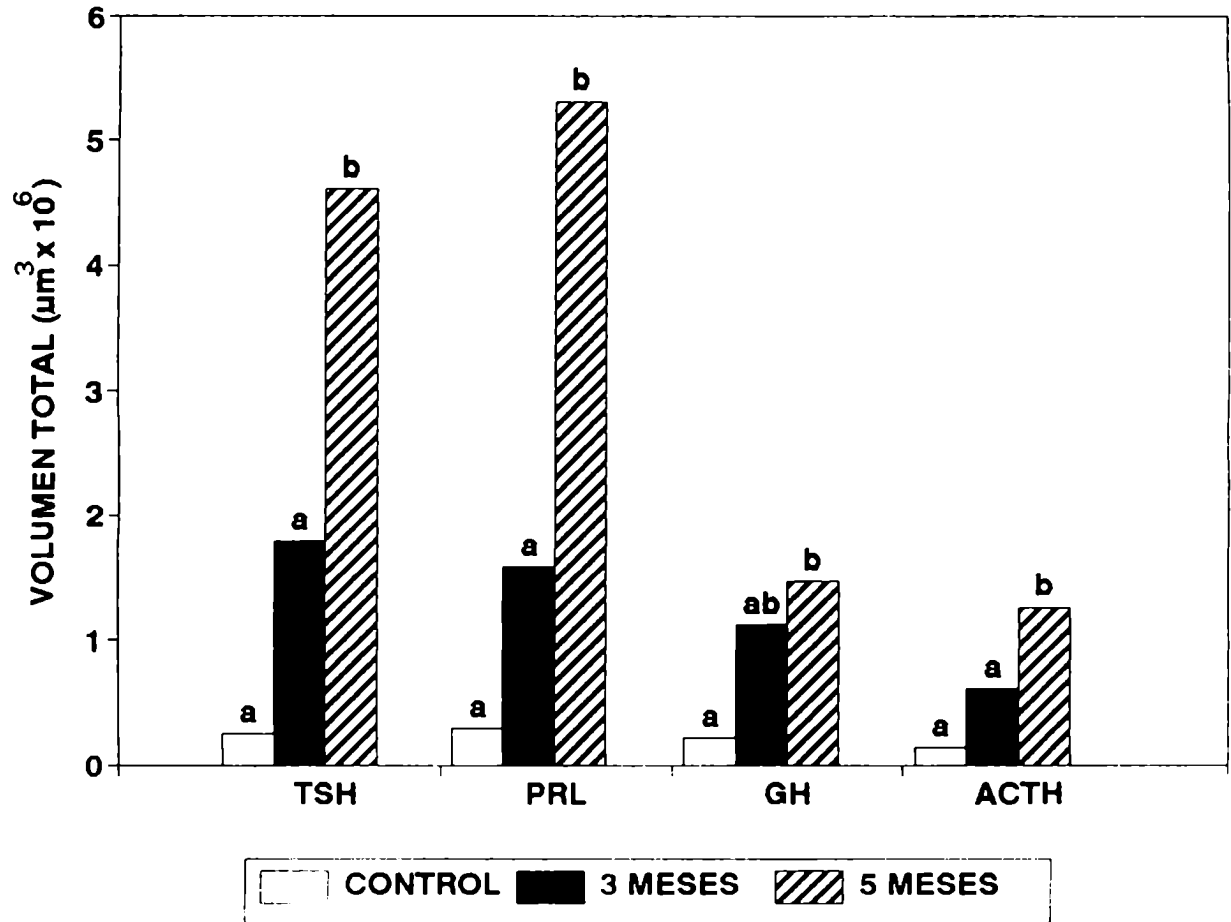


Fig. 39 Volumen total ocupado (Vv) por las células inmunorreactivas TSH, PRL, GH y ACTH de la hipófisis de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO₄ (0,034 %). Para cada tipo celular los valores identificados con la misma letra no difieren significativamente, $P < 0,05$. Se representan valores medios (N=5).

Cabe destacar que las larvas mantenidas en KClO_4 durante 5 meses, al suspenderse el tratamiento completaron los procesos metamórficos normalmente. El análisis histológico de las tiroides de estas larvas reveló un cuadro de funcionalidad relativa, mostrando células organizadas en folículos con coloide con algunos signos de reabsorción (Figs. 42, b). Si se continuaba con el tratamiento las larvas comenzaban a morir, mostrando signos de hipoxia y de natación irregular, no llegando a superar los 6 meses de tratamiento.

Volumen glándulas tiroides (VGT). (Figura 43, Tabla 13)

Este parámetro se incrementó drásticamente en las larvas tratadas con respecto a las controles. También se encontraron diferencias significativas en el VGT de las larvas a los 3 y 5 meses de tratamiento.

Altura células foliculares (ACF). (Figura 44, Tabla 13)

Un significativo incremento en este parámetro pudo registrarse en las células foliculares tiroideas de las larvas tratadas con respecto a las controles. A los tres meses los valores tomados duplicaban a los controles y entre 3 y 5 meses de tratamiento la altura celular continuó aumentando encontrándose también diferencias significativas.

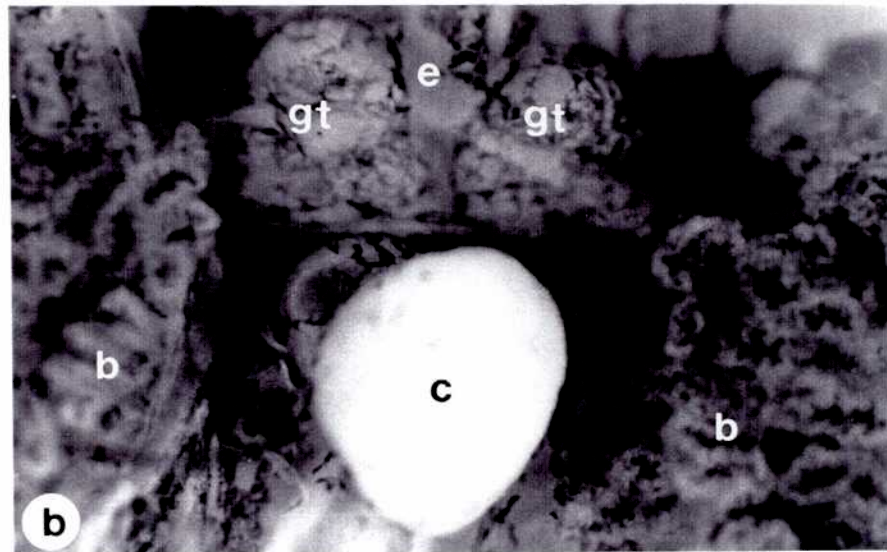
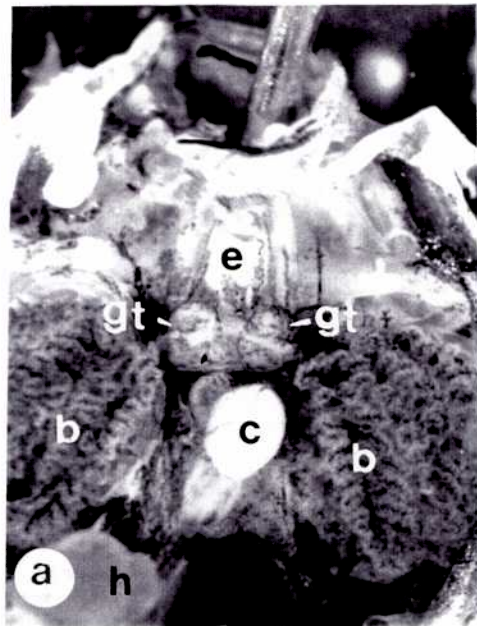


Fig. 40 Observación macroscópica de las glándulas tiroides de larva de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO_4 (0,034 %) durante 3 meses. gt, glándulas tiroides; e, esófago; b, branquias; c, corazón; h, hígado; i, intestino. (a) (5 x), (b) (10 x)

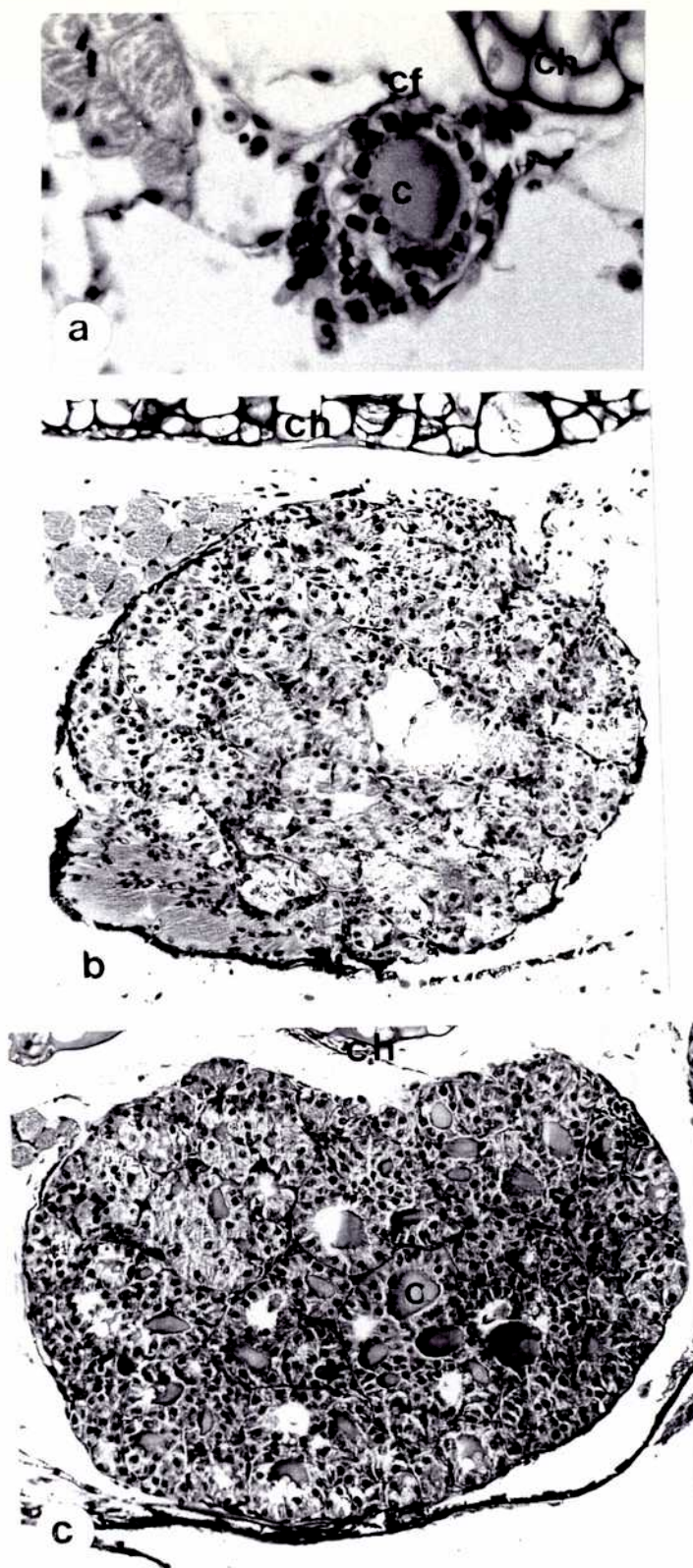


Fig. 41 Glándulas tiroides de larvas mantenidas en solución de KClO_4 (0,034 %) durante 3 y 5 meses. (a) larva control en estadio VIII, (b) 3 meses, (c,d,e) 5 meses. cf, células foliculares; c, coloide; ch, cartílago hioideo. (a,b,c) (400 x), (d) (525 x), (e) (1000 x)

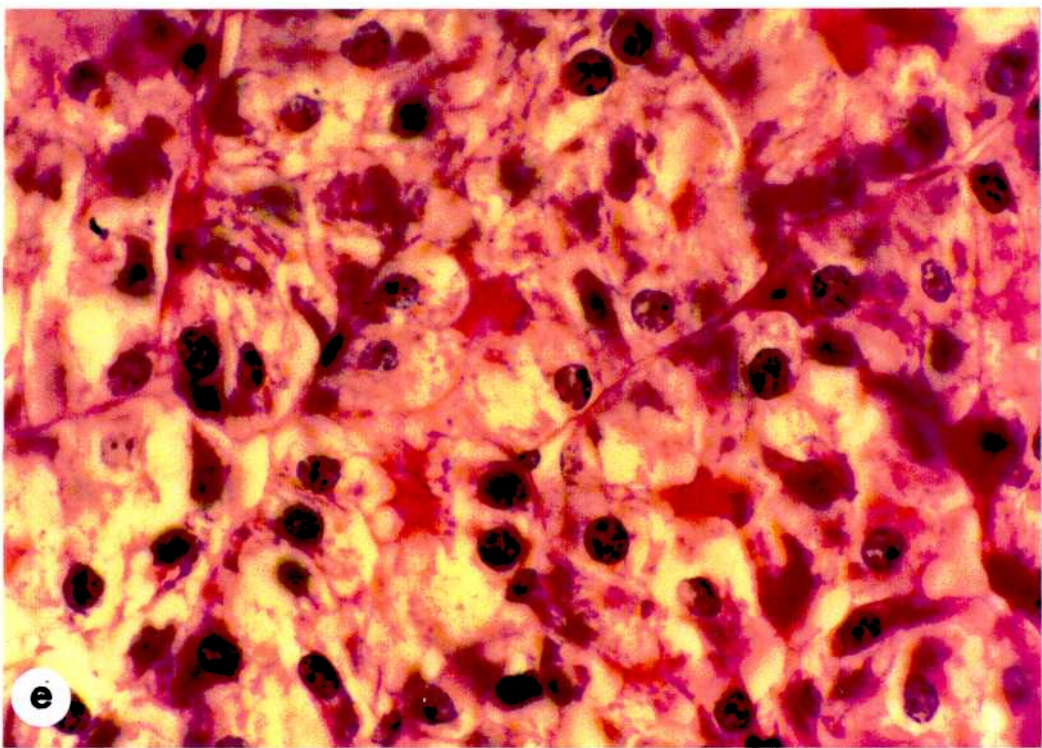
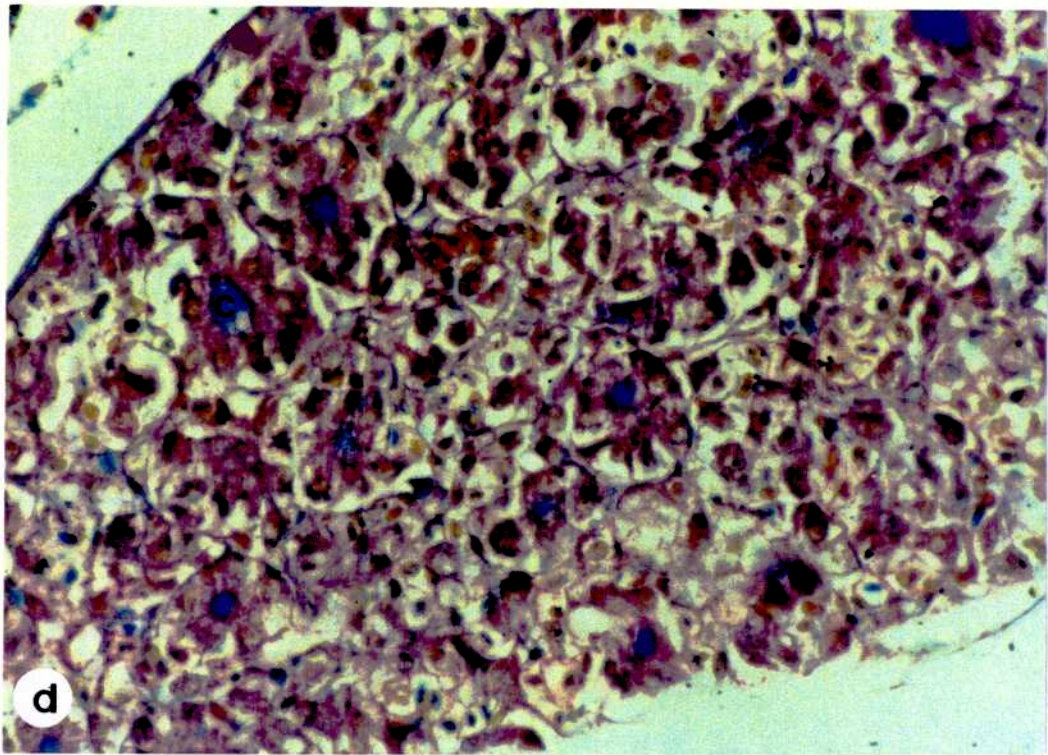


Fig. 41 Continuación.

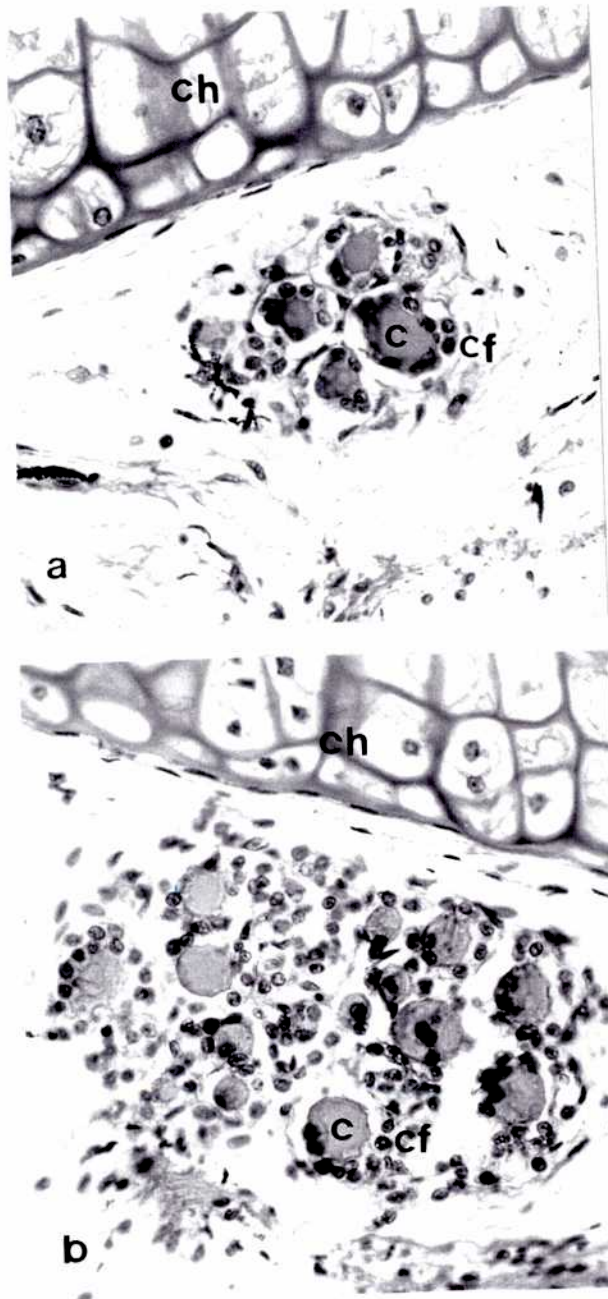


Fig. 42 Glándulas tiroides de larvas mantenidas durante 5 meses en solución de KClO_4 (0,034 %) y luego mantenidas en agua de caño hasta completar la metamorfosis. cf, células foliculares; c, coloide; ch, cartílago hioideo. (a,b) (400 x)

FIGURA 43

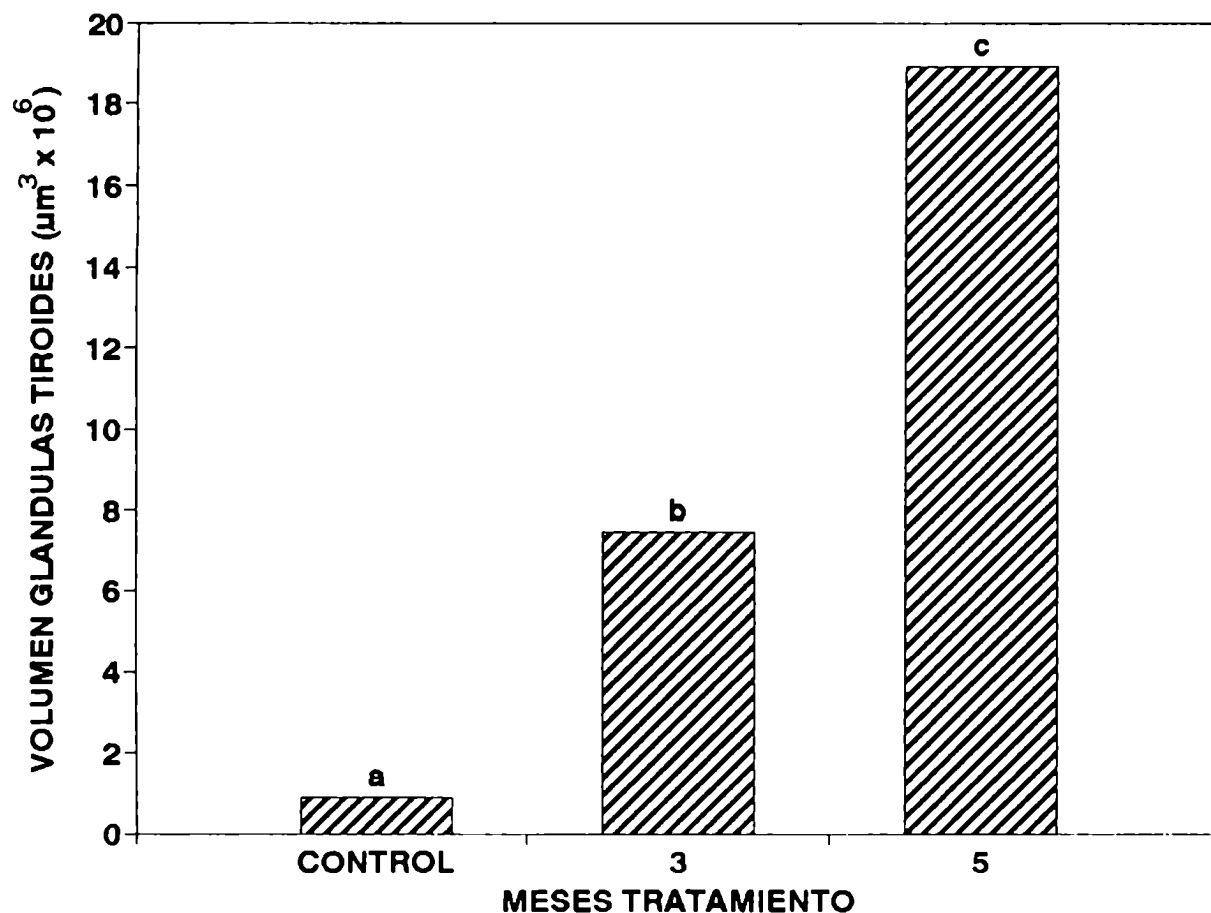


Fig. 43 Volumen de las glándulas tiroides de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO_4 (0,034 %) durante 3 y 5 meses. Los valores identificados con la misma letra no difieren significativamente, $P < 0,05$. Se representan valores medios ($N=5$).

FIGURA 44

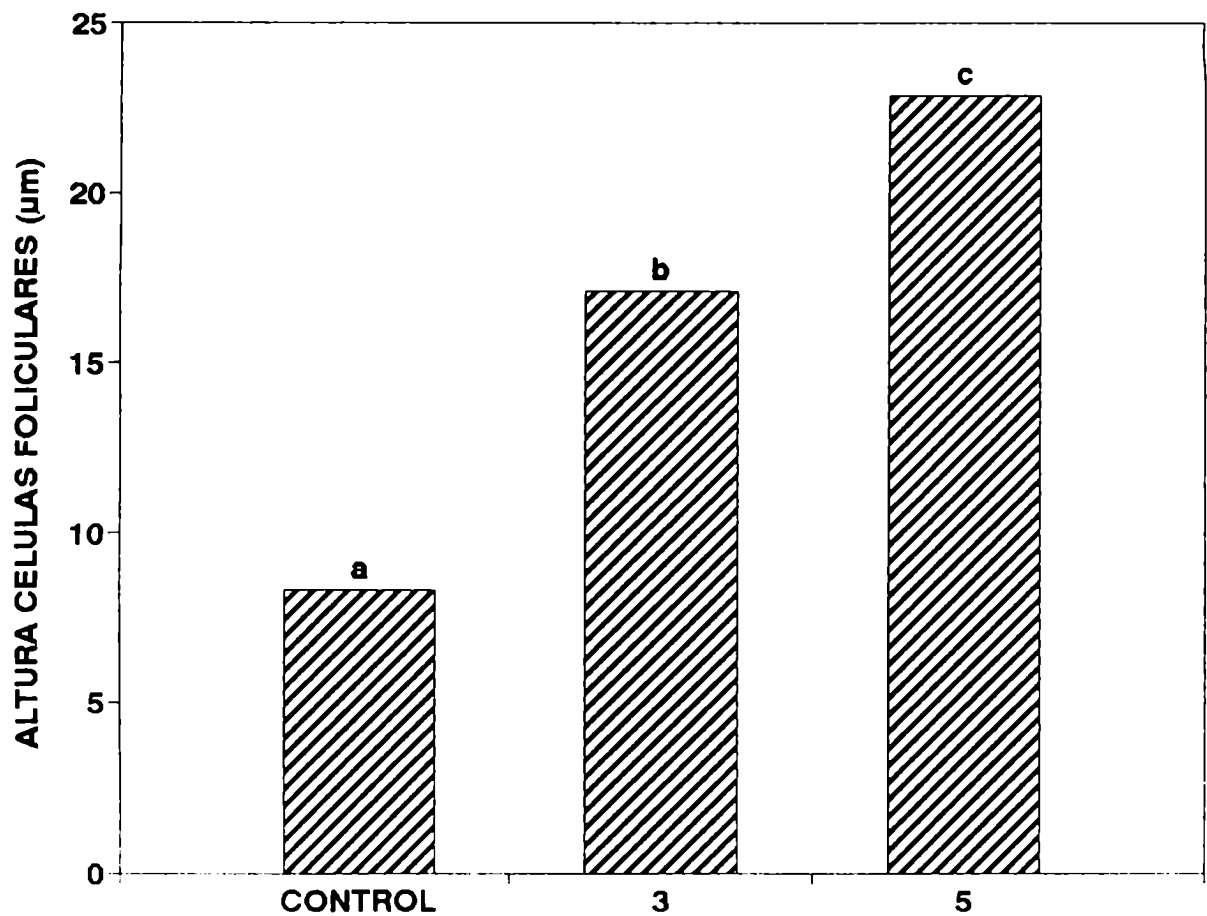


Fig. 44 Altura de las células foliculares tiroideas de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO_4 (0,034 %) durante 3 y 5 meses. Los valores identificados con la misma letra no difieren significativamente, $P < 0,05$. Se representan valores medios ($N=5$).

IV.2.4. Ultraestructurales tiroideas. (Figuras 45,46,47)

Si comparamos las células tiroideas de larvas en estadios al final de la premetamorfosis (*Fig. 45a*) con las células tiroideas de las larvas mantenidas en presencia de goitrógeno, se observa a nivel ultraestructural la misma distribución general subcelular de organelas pero destacándose una marcada hipertrofia celular. A los 3 meses de tratamiento, las células tiroideas se presentan alargadas de forma cilíndrica con el núcleo situado en la zona basal y central. El aumento de tamaño en las células es debido al gran incremento del número de organelas distribuidas por todo el citoplasma celular. Especialmente del RER, muy desarrollado, que ocupa una posición infranuclear (basal) y a los costados del núcleo. En la zona apical se ubican numerosas mitocondrias, vacuolas y gránulos asociados al aparato de Golgi que también se encuentra muy desarrollado. En la interfase coloide-célula se observan gran cantidad de vacuolas con coloide reabsorbido aumentando su número hacia el interior celular (*Figs. 46a, b, c*). Los espacios intracelulares también presentes en las células foliculares de las larvas tratadas son menos evidentes que en otras etapas metamórficas. Cabe destacar que se han encontrado numerosos vasos sanguíneos rodeados por grupos de células tiroideas (*Fig. 46d*). El exámen ultraestructural de las células tiroideas a los 5 meses de tratamiento evidencia las mismas características descritas en las células tiroideas de larvas mantenidas durante 3 meses en presencia de goitrógeno.

Pueden observarse células cilíndricas altas, hipertrofiadas, con gran cantidad de organelas (*Figs. 47a, b, c*) siendo común observar células en cordones rodeando pequeñas porciones de coloide, mostrando folículos desorganizados (*Fig. 47d*). Cabe destacar el aumento en el número y tamaño de organelas celulares implicadas en la síntesis y secreción de tiroglobulinas como ser vacuolas con coloide y lisosomas, RER, aparato de Golgi y mitocondrias (*Figs. 47e, f*).

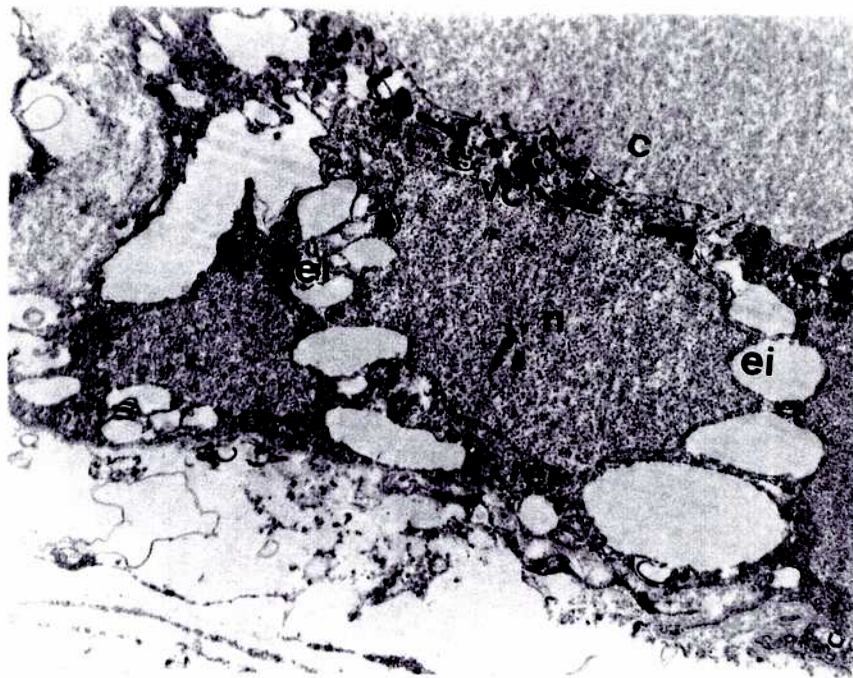


Fig. 45 Célula epitelial folicular tiroidea de larva control en estadio VIII de *Bufo arenarum*. c, coloide; n, núcleo; ei, espacio intercelular; vc, vacuolas coloide; rer, retículo endoplasmático rugoso. (2500 x)

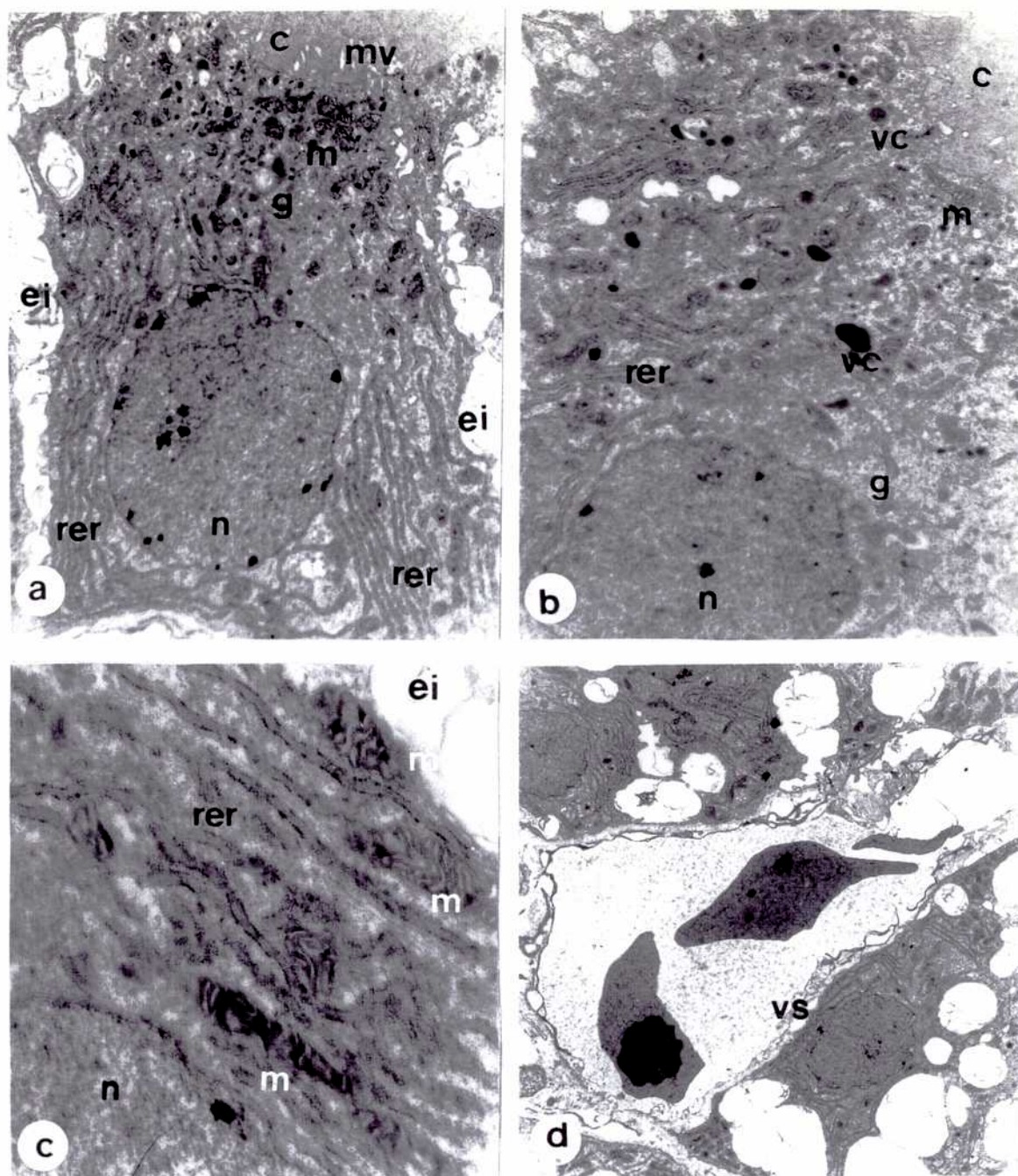


Fig. 46 Célula epitelial folicular tiroidea de larva de *Bufo arenarum* mantenida durante 3 meses en solución de KClO_4 (0,034 %). c, coloide; g, aparato de Golgi; rer, retículo endoplasmático; m, mitocondria; vc, vacuola coloide; n, núcleo; ei, espacio intercelular; mv, microvilli; vs, vaso sanguíneo; e, eritrocito. (a) (3500 x), (b) (3800 x), (c) (7500 x), (d) (2000 x).

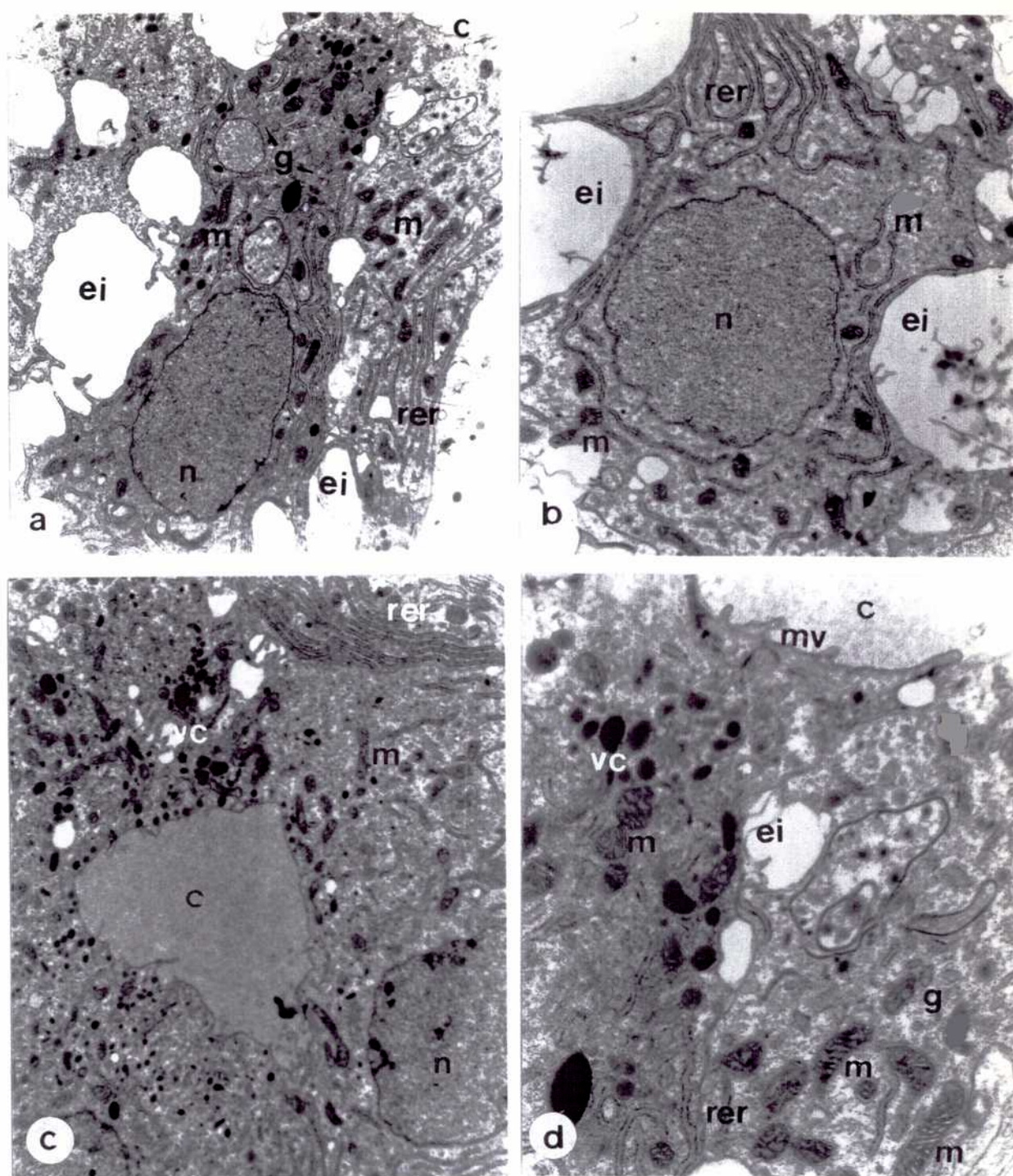


Fig. 47 Célula epitelial folicular tiroidea de larva de *Bufo arenarum* mantenida durante 5 meses en solución de KClO_4 (0,034 %). c, coloide; g, aparato de Golgi; rer, retículo endoplasmático; m, mitocondria; vc, vacuola coloide; n, núcleo; ei, espacio intercelular; mv, microvilli. (a) (3500 x), (b) (3500 x), c (3000 x), (d) (4800 x), (e) (4500 x), (f) (7000 x)

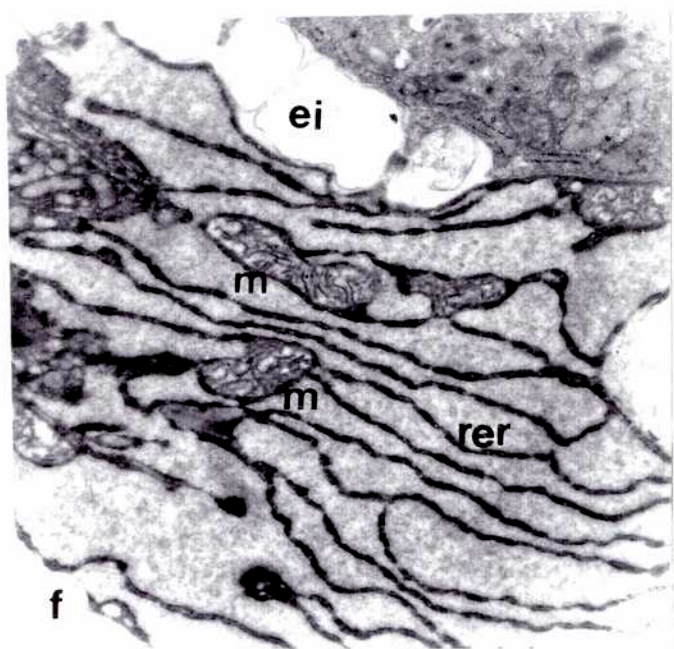
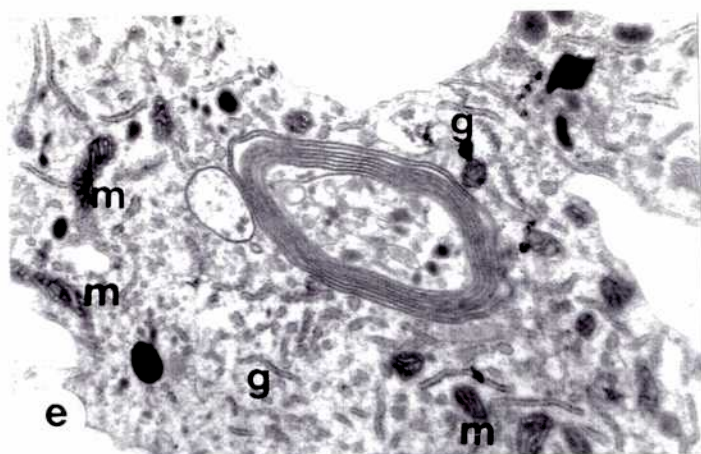


Fig. 47 Continuación.

DISCUSSION

V. DISCUSION.

V.1. Desarrollo y evolución de la pars distalis y la glándula tiroides en condiciones normales.

V.1.1. Modificación del tamaño de los animales.

Junto a las modificaciones morfológicas que caracterizan el desarrollo larvario de anuros, está comunmente aceptada la existencia de una gran tasa de crecimiento durante las primeras fases así como de un descenso del tamaño y peso del ejemplar durante el clímax metamórfico. No obstante, se han realizado pocos trabajos morfométricos en anuros (Taylor y Kollros, 1946; Cambar y Marrot, 1954; Cambar y Gipouloux, 1956) y en estos casos unicamente se han observado las variaciones de la longitud total. Estos autores indican que la longitud máxima se verifica al inicio del clímax metamórfico. Nuestros datos concuerdan con los obtenidos por los autores citados en cuanto al gran incremento de la longitud existente durante la pre- y prometamorfosis pero no coinciden con el momento en que se alcanza la longitud máxima. Nuestros resultados confirman lo observado por Martin *et al* (1985) en *Bufo arenarum*, en cuanto a la longitud total máxima que se obtiene en el estadio XV (final de la prometamorfosis). Durante el clímax se produce un descenso de la longitud total, de cerca del 50 % de la longitud máxima. La reabsorción de la cola parece ser la única responsable de la disminución de la longitud observada durante este periodo ya que si exceptuamos un ligero descenso en la longitud

corporal hacia la mitad del clímax metamórfico, esta se mantiene casi invariable durante este período. En cuanto al peso existe una correlación con lo que ocurre con la longitud total: aumenta durante el desarrollo, llegando a un valor máximo en el estadio XV, y disminuye drásticamente durante el clímax, presumiblemente debido a la reabsorción de la cola. A lo largo del clímax, el cuerpo de la larva sufre una serie de cambios morfológicos que transforman el cuerpo más o menos globular en el de un pequeño adulto, sin que se produzcan modificaciones importantes en su longitud, pero si en su peso.

Una vez finalizada la metamorfosis, según se desprende de los resultados obtenidos en la longitud total y el peso, los ejemplares comienzan a crecer hasta alcanzar el tamaño propio de los adultos de su especie.

V.1.2. Evolución anatómica de la pars distalis.

Tanto en *Bufo arenarum* como en especies previamente estudiadas (Kerr, 1939, 1966; Doerr-Schott, 1968b, 1970; van Oordt, 1974; Reyrel, 1970; Nyholm, 1977, García-Navarro *et al.*, 1988a,b) la pars distalis sufre modificaciones anatómicas durante el desarrollo no presentando variaciones de importancia entre especies, lo que permite establecer un patrón general para los anfibios anuros.

Según este patrón, una vez terminada su migración desde la zona anterior de la cabeza hasta su localización definitiva en la zona infundibular diencefálica, el esbozo ectodérmico que origina la adenohipófisis, comienza a diferenciar las distintas regiones que la integran. Al inicio de la premetamorfosis, las células del esbozo adenohipofisario sufren una reorganización y un reagrupamiento que conducen a la separación de la pars distalis y la pars intermedia. La pars distalis, situada rostro-ventral con respecto a la pars intermedia, aumenta de tamaño y modifica su posición desplazándose bajo esta última hasta adoptar una localización más caudal. El aparente desplazamiento de la pars intermedia sobre la pars distalis podría deberse más a una diferente tasa de crecimiento entre los dos lóbulos, que a una migración real de la pars intermedia.

Nuestras observaciones en los juveniles concuerdan con las de Reyrel (1970) y García-Navarro *et al.* (1988a,b) en cuanto a la pars distalis que no alcanza su configuración anatómica definitiva al final del clímax metamórfico, sino que continúa modificándose a lo largo del período juvenil hasta alcanzar la morfología típica del adulto.

Si bien no existen en bibliografía suficientes datos cuantitativos sobre las variaciones sufridas por el volumen de la pars distalis durante el desarrollo en distintas especies, nuestros resultados concuerdan con lo observado por García-Navarro *et al.* (1988a,b) en *Bufo calamita*, *Pelobates*

cultripes, *Rana perezi*, y *Alytes cisternasii*. Estos datos permiten generalizar sobre la existencia de un crecimiento acentuado de la pars distalis a lo largo de la pre- y prometamorfosis lo que coincide con el periodo de crecimiento larval. A lo largo de estas etapas, la pars distalis de *Bufo arenarum* aumenta su volumen cerca de 4,5 veces. Durante el clímax se produce una disminución de tamaño de la pars distalis ya señalada por Reyrel (1970) en *Pelobates cultripes*, aunque sus observaciones no fueron corroboradas por datos cuantitativos. Este fenómeno coincide con la pérdida de peso de la pars distalis observada por Hsú *et al.* (1976).

Los cambios anatómicos que se producen a nivel cefálico durante el clímax podrían ser la causa de esta disminución ya que al disminuir el espacio disponible, las células de la pars distalis se verían obligadas a reagruparse reduciendo sus espacios intercelulares y/o su tamaño celular. Otra posible causa podría ser una disminución del número de células que la componen, siendo así mismo posible una combinación de todos estos fenómenos. Nuestros datos sugieren una disminución del tamaño de la pars distalis por degranulación o degeneración celular de las células que la componen durante el clímax metamórfico.

En ejemplares juveniles de un mes de vida, no se observó un incremento en el volumen de la pars distalis, en cambio

se ha notado incremento en este parámetro en juveniles de un año (García-Navarro *et al.*, 1988a,b).

V.1.3. Identificación inmunocitoquímica de las células de la pars distalis.

La aplicación de los métodos inmunocitoquímicos al estudio de la hipófisis durante el desarrollo de anfibios favoreció en gran manera la identificación del origen celular de las hormonas hipofisiarias. (ver revisiones de Doerr-Schott, 1980; Girod, 1983). Basadas en la alta especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo, estas técnicas ofrecieron un complemento muy útil a los métodos citológicos y citofisiológicos clásicos.

En el presente estudio, las células TSH, PRL, GH y ACTH inmuorreactivas fueron identificadas en *Bufo arenarum* en todos los estadios analizados. Las primeras células inmuorreactivas de los tipos celulares estudiados aparecen claramente durante la premetamorfosis temprana. Estas observaciones concuerdan con lo señalado para otras especies anuras (Moriceau-Hay *et al.*, 1979, 1982; García-Navarro *et al.*, 1988a,b; Guastalla y Campantico, 1990). La presencia generalizada de células inmuorreactivas a los distintos anticuerpos utilizados a comienzos de la premetamorfosis parece indicar que la diferenciación morfofuncional de las células de la pars distalis tiene lugar al final del período embrionario, coincidiendo con la reorganización que originará la separación entre la pars distalis y la pars intermedia.

A través del desarrollo, las células TSH inmunorreactivas, se identificaron principalmente en la zona centroventral de la pars distalis de *Bufo arenarum*. Observaciones semejantes fueron reportadas, tanto en anfibios adultos (Girod, 1983; Doerr-Schott y Zuber-Vogeli, 1984; Malagón et al., 1988; Yamashita et al., 1991) como así también en estadios larvales (Moriceau-Hay et al., 1982; García-Navarro et al., 1988a).

Utilizando anticuerpos anti-PRL humana, las células PRL inmunorreactivas en las larvas de *Bufo arenarum* mostraron una ubicación similar a la descrita en *Nectophrynoïdes occidentalis* (Zuber-Vogeli y Doerr-Schott, 1984), *Pelobates cultripes*, *Rana perezi* (García-Navarro et al., 1988b), ocupando toda la pars distalis (a excepción de la porción caudal) mientras que en *Bufo calamita*, *Alytes cisternasii* y *Hyla meridionalis* se encuentran ubicadas en los 2/3 posteriores de la pars distalis (García-Navarro et al., 1988b). Sin embargo usando antisuero contra PRL de bullfrog, Yamamoto et al. (1986a) en larvas de *Rana catesbeiana*, Yamashita y Kikuyama (1994) en *Xenopus laevis* y Guastalla and Campantico (1990) en *Rana dalmatina* han identificado células de PRL principalmente en la parte anterior de la pars distalis.

La distribución topográfica de las células GH inmunorreactivas en la pars distalis larval de *Bufo arenarum* en las zonas central y caudal ha coincidido con lo observado en larvas de *Xenopus laevis* (Moriceau-Hay et al. 1979),

Nectophrynoïdes occidentalis (Zuber-Vogeli y Doerr-Schott, 1984), *Discoglossus pictus* (Gracia-Navarro et al., 1986) y *Rana dalmatina* (Guastalla y Campantico, 1990). Recientemente Yamashita y Kikuyama (1994) han observado análoga distribución de las células GH en larvas de *Xenopus laevis*, usando antisueros contra hormona de crecimiento de *Rana catesbeiana*.

La sucesiva y gradual localización de las células ACTH inmunorreactivas en las zonas rostral y dorsal del lóbulo distal de las larvas de *Bufo arenarum*, corrobora lo descrito por Moriceau-Hay et al. (1982) en *Xenopus laevis* y en *Rana dalmatina* por Guastalla y Campantico (1990). Es importante mencionar que las células de la *pars intermedia* exhibieron inmunorreactividad al anticuerpo contra ACTH 1-24 sintética humana en nuestros preparados. Observación análoga fue descrita por Girod (1983) y Doerr-Schott y Zuber-Vogeli (1984). Estas células inmunorreactivas probablemente representen las productoras de hormona melanocito-estimulante (MSH). Es sabido que las células ACTH de la pars distalis y las células MSH de la pars intermedia, sintetizan una glicoproteína que contiene la secuencia completa de la ACTH, MSH, y de la β -endorfina; esta molécula precursora común ha sido denominada propiomelanocortina (POMC).

La homogeneidad en la distribución de las células TSH, PRL, GH y ACTH, sugiere la no colocación de estos tipos

celulares y que salvo algunas excepciones muestran el mismo patrón de distribución en la clase Anfibia.

V.1.4. Evolución de los parámetros morfométricos de la pars distalis.

El número de células inmunorreactivas es un parámetro que permite conocer la evolución de las poblaciones de las células inmunorreactivas estudiadas.

La densidad de volumen es un parámetro estereológico que, en nuestro estudio, indica la proporción de volumen de la pars distalis que ocupan las células inmunorreactivas a los distintos anticuerpos utilizados. Al ser un parámetro relativo refleja los cambios que se producen en los distintos tipos celulares durante el desarrollo, con independencia de las variaciones que se produzcan en el volumen de la pars distalis.

El volumen total ocupado por las células inmunorreactivas, al ser un parámetro absoluto y reflejar la cantidad de inmunorreacción existente en la glándula, proporciona una aproximación a la cantidad de hormona almacenada en la pars distalis.

La hormona tireotrópica cumple un importante rol durante la metamorfosis, estimulando la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas (Gorbman *et al.*, 1983; Norris, 1985; Rosenkilde y Using, 1990). En el presente estudio el número

celular, la densidad de volumen, y el volumen total ocupado por las células TSH inmunorreactivas, se incrementaron durante los estadios de pre-y prometamorfosis, caracterizados por niveles bajos de hormonas tiroideas plasmáticas, mientras que al inicio del clímax, caracterizados por un elevado nivel de hormonas tiroideas, todos estos parámetros decrecieron. Estos resultados que son similares a lo observado en *Rana perezi* y *Bufo calamita* por García-Navarro *et al.* (1988a) indicarían una liberación hormonal al inicio del clímax, observada por Dodd y Dodd (1976) en *Rana catesbeiana*. Esta liberación propiciaría la síntesis y secreción de una gran cantidad de hormonas tiroideas que dispararían el clímax y provocarían los cambios metamórficos.

Durante el desarrollo de *Bufo arenarum*, el número de células PRL inmunorreactivas se incrementó hasta la mitad del clímax, decreció al final de esta etapa, y en ejemplares postmetamórficos se incrementó nuevamente. Estos resultados concuerdan con los de Yamamoto *et al.* (1986a), y con los de Yamashita y Kikuyama (1994) quienes observaron en *Rana catesbeiana* y *Xenopus laevis* respectivamente que la población de células de PRL se incrementaba según la metamorfosis progresaba y decrecían al final del clímax. Por otra parte, Clemons y Nicoll (1977b), Yamamoto y Kikuyama (1982a) en *Rana catesbeiana* y Niinuma *et al.* (1991) en *Bufo japonicus*, han observado que los niveles de prolactina plasmática son relativamente bajos durante la pre- y prometamorfosis y elevados hacia el final del clímax. Estos resultados

concuerdan con los valores obtenidos por nosotros en la densidad de volumen y volumen total ocupado por las células de PRL en *Bufo arenarum* y por García-Navarro *et al.* (1988b) en *Rana perezi*, *Alytes cisternasii* e *Hyla meridionalis*. El significado fisiológico del elevado nivel de prolactina durante el final del clímax es aún incierto, si bien no debe descartarse la función osmorreguladora de esta hormona en animales postmetamórficos.

La hormona del crecimiento produce claros efectos somatotrópicos después de la metamorfosis, pero su rol en larvas es desconocido (Gracia-Navarro *et al.*, 1986). Sin embargo fue demostrado que la PRL promueve el crecimiento sólo de los órganos larvales (branquias, cola, etc) y que la hormona del crecimiento estimularía el crecimiento somático general durante la ontogenesis (Dodd y Dodd., 1976; White y Nicoll., 1981). En *Bufo arenarum*, los valores obtenidos para las células GH inmunorreactivas, densidad de volumen, y volumen total, mostraron un incremento durante el desarrollo y una disminución al final de la prometamorfosis (estadios de máximo crecimiento larval) y durante el clímax. Resultados similares en el número de células GH fueron obtenidos en *Xenopus laevis* por Yamashita y Kikuyama (1994).

Es sabido que los niveles plasmáticos de corticosterona (Jaffe, 1981) y de aldosterona (Kikuyama *et al.*, 1986) son elevados durante el clímax metamórfico, y que su liberación estaría influenciada por los altos niveles de hormonas

tiroideas. Se ha demostrado el efecto promotor de la metamorfosis de la aldosterona, actuando en forma sinérgica con las hormonas tiroideas, incrementando la unión nuclear de la T₃ (Niki *et al.*, 1981), y causando el encogimiento de segmentos de cola de *Rana catesbeiana* (Kikuyama *et al.*, 1983a,b). Por otra parte también fue demostrado en *Xenopus laevis* que las hormonas tiroideas potencian la estimulación de las células interrenales por ACTH, permitiendo la liberación de grandes cantidades de corticosterona y aldosterona, necesarias para la culminación de la metamorfosis (Leloup-Hatey *et al.*, 1990). Los mismos autores sugieren que el normal progreso de la metamorfosis dependería del adecuado equilibrio entre corticosterona y de las hormonas tiroideas.

En nuestros estudios, el número de células ACTH inmunorreactivas en la pars distalis de *Bufo arenarum*, no varió durante la premetamorfosis, pero el volumen de la pars distalis aumentó; por esta razón se observa una declinación en la densidad de volumen en los primeros estadios del desarrollo para las células ACTH. Durante la prometamorfosis la población de células ACTH y el volumen total ocupado aumentan en forma paralela hasta el principio del clímax metamórfico, disminuyen hacia la mitad del clímax, y nuevamente se incrementan hacia el final de la metamorfosis. La densidad de volumen para las células ACTH se incrementó desde la mitad de la prometamorfosis hasta el final de la

metamorfosis, debido a la combinación del incremento y mantenimiento de la población de células y a la disminución del volumen de la pars distalis en estas etapas. Si bien algunos de los parámetro analizados indicarían que durante el clímax habría liberación hormonal, las modificaciones observadas no son tan evidentes como en los otros tipos celulares de la pars distalis. Es importante mencionar que durante la pre- y prometamorfosis, los valores obtenidos en todos los parámetros medidos para las células ACTH inmunorreactivas, fueron siempre menores que los valores obtenidos en los otros tipos celulares estudiados, mostrando que la ACTH no es relevante en el desarrollo larval temprano de *Bufo arenarum*.

Los resultados de los parámetros morfométricos obtenidos sobre las células de la pars distalis durante el desarrollo de *Bufo arenarum* nos conducen a concluir que durante el crecimiento larval (pre-prometamorfosis) hay un período de proliferación de las células TSH, PRL, GH y ACTH y almacenamiento de sus hormonas, y un segundo período de liberación hormonal en el clímax metamórfico, caracterizado especialmente por un alto nivel de hormonas tiroideas, adrenales y de prolactina.

Etkin (1968) postuló altos niveles de prolactina circulante, durante la pre- y prometamorfosis, que harían posible el gran crecimiento de la larva que ocurre durante estos estadios. Sin embargo, los datos obtenidos por RIA

sobre niveles circulantes de PRL (Clemons y Nicoll, 1977b., Yamamoto y Kikuyama 1982b; Niinuma *et al.*, 1991) los de síntesis de proteína (Yamamoto *et al.*, 1986b), los obtenidos por métodos morfométricos por García-Navarro *et al.* (1988a,b) y nuestros resultados, parecen indicar un almacenamiento más que una gran liberación como postuló Etkin. Parece por lo tanto que la hormona del crecimiento cumpliría un rol preponderante en el crecimiento larvario como ya había sido postulado en *Rana temporaria* (Enemart *et al.*, 1968; Enemart, 1978).

El descenso de la síntesis, liberación y niveles circulantes de prolactina durante el clímax metamórfico propuesto por Etkin (1968) favorecería la acción promotora de la metamorfosis por parte de las hormonas tiroideas dado que la función antimetamórfica de la prolactina se vería reducida al mínimo. Estos postulados se contradicen con los altos niveles de prolactina obtenidos (Clemons y Nicoll, 1977b., Yamamoto y Kikuyama 1982b; Niinuma *et al.*, 1991), así como con la liberación que sugieren nuestros resultados. La desaparición una vez iniciada la metamorfosis, de los receptores a PRL en órganos exclusivamente larvarios como branquias y cola, mediada directa o indirectamente por la tiroxina, así como la diferenciación morfofuncional de nuevos órganos diana para la PRL como los riñones (White y Nicoll, 1979), podrían explicar la desaparición de la capacidad antimetamórfica y los alto niveles de PRL, respectivamente.

V.1.5. Evolución anatómica de las tiroides.

El desarrollo morfológico de la larva es regulado en primer nivel por hormonas. No obstante los órganos endócrinos necesitan crecer y diferenciarse para funcionar adecuadamente. En particular las tiroides deben sintetizar y liberar sus hormonas tempranamente en el desarrollo larval, para que la prometamorfosis pueda ser iniciada.

Durante el desarrollo de *Bufo arenarum* las tiroides toman una forma elipsoidal, y los folículos que la constituyen almacenan coloide que durante la pre- y principio de la prometamorfosis cambia de consistencia desde compacto y poco vacuolado, a fracturado, menos denso y muy vacuolado hacia el final del clímax metamórfico. Estas variaciones en la consistencia del coloide indican las etapas de actividad glandular (almacenamiento o liberación de hormonas).

Las células parafoliculares que ocasionalmente se observaron en algunos estadios de la metamorfosis de *Bufo arenarum*, y que también se encontraron en *Xenopus laevis* (Coleman, 1968) no pueden relacionarse directamente con los procesos metamórficos, siendo su función aún incierta.

V.1.6. Evolución de los parámetros morfométricos de las tiroides.

El análisis estructural clásico de las glándulas tiroides muestra generalmente un fuerte incremento de actividad cerca

del clímax metamórfico, llegando a niveles nunca encontrados en otros estados de la vida de los anfibios. El coloide folicular que es almacenado como prohormona (tiroglobulina) se incrementa al máximo durante la prometamorfosis y decrece en el clímax, dejando al final de esta etapa los folículos vacíos, colapsados, demostrando la terminación de un fuerte período de síntesis y secreción hormonal. Paralelamente a estos acontecimientos se ha observado un aumento en la altura de las células foliculares y su posterior disminución en el clímax metamórfico (Saxen *et al.*, 1957a,b; Coleman *et al.*, 1968; Fox, 1983; Rosenkilde y Using, 1990).

Los parámetros morfométricos analizados en nuestro estudio (Shirai *et al.*, 1992; Gancedo *et al.*, 1992) nos han permitido evaluar las distintas etapas de actividad de las glándulas tiroideas durante el desarrollo de *Bufo arenarum*. Los resultados obtenidos concuerdan en gran parte con lo observado en numerosas especies de anuros por los autores antes mencionados. En el caso del VGT y DF un incremento en los valores de estos parámetros significa un crecimiento de la glándula y almacenamiento de prohormona, mientras que el aumento de la ACF y del NF indican mayor actividad glandular. Durante las primeras etapas del desarrollo larval se observó un incremento considerable de todos los parámetros analizados. En el caso del VGT y DF hasta el final de la prometamorfosis (indicando máximo almacenamiento de tiroglobulinas) y para la ACF y el NF hasta la mitad del clímax metamórfico (pico de liberación hormonal). Al final

del clímax todos los parámetros estudiados disminuyeron abruptamente indicando el vaciamiento y cese de actividad de las tiroides.

En ejemplares postmetamórficos se observó un aumento en el VGT y en el DF mientras que la ACF y el NF se mantuvieron en los valores registrados al final de la metamorfosis. Estos incrementos indican un aumento en la acumulación de tiroglobulinas; es probable que este resultado se relacione con la diferenciación sexual de *Bufo arenarum* que ocurre entre los 30 y 40 días después de la culminación de la metamorfosis (Pisanó y Pizarro, 1957).

Las tiroides de *Bombina bombina*, *Bombina variegata*, *Pelobates fuscus*, *Hyla arborea*, *Rana temporaria* y *Xenopus laevis*, fueron investigadas cuali- y cuantitativamente durante el desarrollo larval, observándose que la máxima actividad en términos de volumen, superficie secretoria, número de folículos, y coloide vacuolado, coincide con el período de emergencia de los miembros anteriores (ver Fox, 1983). Estas observaciones concuerdan con los resultados en *Bufo arenarum*, donde se evidenció que la máxima actividad glandular ocurre entre los estadios XV y XVII, recordando que la emergencia de los miembros anteriores tiene lugar en el estadio XVI.

El estudio aquí expuesto descripto muestra un paralelismo entre la ultraestructura tiroidea y su actividad

endocrinológica, mostrando los efectos de la tirotrófina endógena en la morfología del epitelio folicular tiroideo durante la metamorfosis. La estimulación tirotrófica sería la causante del incremento de la altura celular, acompañado por el aumento del aparato de Golgi, del RER (sugiriendo aumento en la síntesis proteica), del número de mitocondrias (sugiriendo aumento de la producción energética), y del número de citosomas (vacuolas con coloide y lisosomas). Muchas de estas respuestas a la espontánea estimulación tirotrófica en *Bufo arenarum* han sido inducidas experimentalmente por inyecciones de TSH en *Ambystoma tigrinum*, *Triturus torosus*, *Triturus viridescens* (Herman, 1960).

Una de las características más evidentes en las tiroides de *Bufo arenarum* es la presencia de espacios intercelulares o canales bien desarrollados, formados por la separación de la membrana plasmática lateral, la misma observación fue realizada por Coleman *et al.* (1968) en *Xenopus laevis*. Es probable que estos canales intercelulares estén aumentados como resultado de los procesos de fijación, sin embargo estudios sobre los efectos de diferentes fijadores en tiroides humanas sugieren que estos canales intercelulares representan estructuras reales y no artefactos de técnica (Irie, 1960; Heimann, 1966). Se sugiere que estos canales intercelulares podrían desempeñar un rol en el pasaje de las hormonas tiroideas desde las células foliculares a los capilares perifoliculares (Young, 1966). No se observaron en

las células foliculares de *Bufo arenarum* diferencias importantes en las microvellosidades apicales, ni pseudopodios prominentes hacia el lumen folicular durante la metamorfosis; lo que indicarían que la reabsorción del coloide se lleve a cabo por micropinocitosis.

Nuestras observaciones en *Bufo arenarum*, permiten emitir la hipótesis que la máxima liberación de tirotrofina ocurre entre los estadios XV y XVII (fin de la prometamorfosis y mitad del clímax) y el pico de liberación de hormonas tiroideas entre los estadios XVII y XX (mitad y final del clímax). El retardo existente entre la liberación de tirotrofina y el incremento plasmático de los niveles de hormonas tiroideas encontrados por diversos autores (Leloup y Buscaglia, 1977; Miyauchi *et al.*, 1977; Regard *et al.*, 1978; Mondou y Kaltenbach, 1979; Susuki y Suzuki, 1981; Weil, 1986) a mediados del clímax podrían reflejar el tiempo que necesita la maquinaria de biosíntesis y liberación de hormonas tiroideas para actuar después de la estimulación por tirotrofina.

V.2. Efecto del goitrógeno Perclorato de potasio en el desarrollo y evolución de la pars distalis y de las glándulas tiroideas.

V.2.1. Modificación del tamaño de los animales.

En nuestro experimento las larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de $KClO_4$ después de la eclosión durante 5 meses, no pudieron superar la etapa de

premetamorfosis, permaneciendo en el estadio VIIII de esta etapa a partir del tercer mes de tratamiento. El detenimiento en el desarrollo no impidió el crecimiento corporal de las larvas tratadas tanto en longitud como en peso, que fue ininterrumpido hasta el final del experimento, obteniéndose larvas "gigantes" de aproximadamente 40 mm de longitud total y 1 g de peso. En las primeras semanas de tratamiento no hubo diferencias significativas en las variables registradas. A las 8 semanas de tratamiento se presentó una diferencia significativa de los estadios metamórficos en los que se encontraban las larvas control (estadios X-XI, comienzo de la prometamorfosis) y las tratadas (estadios VI-VII, fin de la premetamorfosis). Entre la semana 10 y 11 del tratamiento las larvas control entraron en la etapa de clímax metamórfico, caracterizada por la reducción de la longitud total y el peso, mientras que las tratadas que se encontraban en estadios VII-VIII continuaron incrementando su tamaño corporal. Estos resultados indican que en las etapas tempranas del desarrollo caracterizadas por el crecimiento larval, las hormonas tiroideas no cumplirían un rol predominante. En cuanto que a partir de la prometamorfosis y especialmente en el clímax metamórfico son necesarias altas concentraciones de hormonas tiroideas para poder superar los eventos metamórficos.

Cabe destacar que las larvas tratadas mantienen las mismas características morfológicas externas de las larvas normales

en estadio VIII, observándose solamente un notable aumento en el tamaño del cuerpo y cola.

Si bien no se encontraron diferencias significativas en los parámetros registrados en las larvas tratadas con las diferentes dosis de goitrógeno durante todo el experimento, cabe señalar que soluciones de $KClO_4$ mayores al 0,051 % provocaron la muerte de las larvas y concentraciones menores no causaran efectos de retardo del desarrollo en los tiempos utilizados en nuestros experimentos (datos no publicados). Es importante señalar que la acción del $KClO_4$ pudo ser revertida con la suspensión del tratamiento y del mantenimiento de las larvas en agua de canilla hasta completar la metamorfosis.

V.2.2. Evolución anatómica de la pars distalis.

Los resultados obtenidos a nivel macroscópico como así también el análisis histológico preliminar de las hipófisis de larvas mantenidas en goitrógeno, indicaron un drástico aumento en el tamaño de esta glándula. Especialmente del volumen de la pars distalis, indicando un cuadro de hiperplasia e hipertrofia de las células que la componen. Cabe destacar que no hubo un mayor desarrollo de otras partes de la hipófisis como ser la eminencia media, pars intermedia o pars nervosa, estas observaciones podrían indicar la necesidad de las hormonas tiroideas para el normal desarrollo de estas partes de la hipófisis larval de *Bufo arenarum*.

V.2.3. Identificación inmunocitoquímica de las células de la pars distalis.

La distribución topográfica de los tipos celulares estudiados en las larvas tratadas, sufrió algunas modificaciones con respecto a la distribución encontrada en las larvas control en el mismo estadio. Las células TSH inmunorreactivas se reconocieron por toda la glándula y la inmurreacción obtenida fue menos intensa; mientras que en las larvas control sólo se distribuyeron en la zona centro ventral de la pars distalis. La menor inmunorreacción es un signo de liberación hormonal y el incremento del área de distribución indica un aumento de estimulación sobre las células TSH, resultado coincidente con lo observado en larvas de *Bufo japonicus* mantenidas en el goitrógeno tiourea por dos semanas (Kurabuchi *et al.*, 1992).

Tanto para las células de PRL, como así también para las GH y ACTH no hay datos bibliográficos previos sobre algún cambio en la distribución en larvas mantenidas en sustancias goitrógenas. Sin embargo cabe destacar el cambio de localización de las células PRL y ACTH (presentes en escaso número) que se observó en las larvas experimentales, identificándose ambos tipos celulares en la región dorsal de la glándula, si bien las de PRL ocuparon también la zona central de la misma.

V.2.4. Evolución de los parámetros morfométricos de la pars distalis.

Los resultados obtenidos en los parámetros morfométricos medidos muestran que en larvas premetamórficas con la función tiroidea inhibida por varios meses, las células hipofisarias TSH, PRL, GH y ACTH, incrementan tanto sus poblaciones, como así también la síntesis y almacenamiento de sus hormonas con diferentes patrones.

Es sabido que larvas mantenidas durante algunas semanas en sustancias goitrógenas, como el propiltiouracilo, presentan hipertrofia tiroidea (Goos, 1978; Rosenkilde, 1979), degranulación e hipertrofia de las células TSH, como así también degranulación e hiperactividad de la zona dorsal magnocelular del núcleo preóptico (Goos, 1978), centro sintetizador de TRH (Mimnagh et al., 1987). Mientras que la inyección de T₄ produce efectos opuestos (Goos, 1968b).

Por otra parte, la TRH está presente en extractos cerebrales de larvas de *Rana catesbeiana* (Mimnagh et al., 1987; Taniguchi et al., 1990) y se ha demostrado el incremento de su concentración durante la prometamorfosis y el clímax metamórfico en *Xenopus laevis* (King y Millar, 1981; Bray y Sicard, 1982; Balls et al., 1985). Por otra parte, numerosos estudios sobre anfibios tanto *in vivo* como *in vitro*, han demostrado que TRH estimula tanto la síntesis como la liberación de TSH y PRL (Darrás y Kühn, 1982; Kühn

et al., 1985; Malagón *et al.*, 1989; Gracia Navarro *et al.*, 1990; Nakajima *et al.*, 1993).

Postulamos la hipótesis que en nuestro experimento, el fuerte incremento en el número celular, densidad de volumen, y volumen total ocupado por las células TSH y PRL inmunorreactivas en la pars distalis de las larvas tratadas estaría relacionado con un aumento en la liberación de TRH por el hipotálamo, inducido por una falta de hormonas tiroideas en circulación (Etkin, 1964, 1968, Hourdry, 1993) o directamente por una acción sobre la pars distalis. Recientemente Jacobs y Kühn (1992) demostraron que las hormonas tiroideas ejercen un fuerte control de "feedback" negativo sobre la secreción de tirotrofina en ranas adultas. Sin embargo la inyección de TRH (de mamífero) en larvas anuras, no afectó la metamorfosis (Denver y Licht, 1989), aunque un efecto acelerador de los procesos metamórficos fue reportado por Etkin y Kin (1971) y Shiomi *et al.* (1972). Estas diferencias en los resultados podrían depender de las concentraciones, métodos de administración, estadios larvales, y duración de los experimentos. Recientemente Gancedo *et al.* (1992) han demostrado que otras hormonas hipotalámicas como la hormona liberadora de corticotropina (CRH), y no TRH, estimularían a las células productoras de tirotrofina. Sin embargo en nuestro estudio, el número de células y el volumen total ocupado por las células ACTH se incrementan levemente a los 3 y 5 meses de tratamiento, y la

densidad de volumen no se modificó entre larvas normales y experimentales.

Con respecto a las células GH, algunos autores demostraron el efecto estimulador de la TRH sobre la síntesis y liberación de esta hormona en anfibios (Hall y Chadwick, 1984; Gracia-Navarro *et al.*, 1990). Nuestros resultados muestran que la población de células GH, y el volumen total ocupado por este tipo celular se incrementan en las larvas experimentales. Sin embargo la densidad de volumen sufrió un leve decremento en las larvas tratadas. Estos resultados indicarían que la TRH sería un moderado estimulador de las células GH en las larvas de *Bufo arenarum*.

Nuestros resultados, indicarían que en larvas de *Bufo arenarum*, sometidas a una deficiencia crónica de hormonas tiroideas, las células TSH, PRL, GH y ACTH son capaces de desarrollarse y que la ausencia de hormonas tiroideas ejercería un fuerte control de feedback en la síntesis y almacenamiento de prolactina y tirotrofina, y en menor grado sobre la hormona del crecimiento y la adrenocorticotropina. Este control podría ser directo sobre la pars distalis hipofisaria, o indirecto, por aumento de TRH u otro factor hipotalámico.

V.2.5. Evolución de los parametros morfométricos de las tiroides.

El drástico incremento observado tanto en el volumen de las glándulas tiroides como en la altura de las células foliculares de larvas tratadas por 3 y 5 meses, con respecto a los controles puede explicarse en respuesta a una sobrestimulación de la glándula vía tirotrofina. Ha sido observado que el volúmen de la glándula tiroides es generalmente inversamente proporcional a la concentración de hormonas tiroideas plasmáticas (ver Fox, 1983).

Tanto el número de folículos como el diámetro del folículo más ancho no pudieron registrarse ya que el coloide se encontraba casi totalmente reabsorbido y los folículos desorganizados. Nuestros resultados en *Bufo arenarum* confirman en parte los obtenidos en *Rana* y *Xenopus* en los que utilizando otros goitrógenos como la tiourea y el propiltiouracilo, se describieron tiroides hiperplásicas con extensos folículos llenos de coloide compacto (Guardabassi *et al.*, 1964; Fox, 1983; Yamashita *et al.*, 1990). La diferencia en la organización de folículos y la presencia de coloide se debe a la distinta acción de las sustancias goitrógenas. El perclorato de potasio inhibe la captación y transporte del yoduro, impidiendo la formación de tiroglobulinas; en cambio el propiltiouracilo o la tiourea inhiben la transformación del yoduro a yodo orgánico y el acople de iodotirosinas,

permitiendo de esta forma el almacenamiento de tiroglobulinas en folículos, pero no su transformación a T₃ y T₄.

El efecto del goitrógeno propiltiouracilo fue descrito en la ultraestructura de las tiroides del urodelo *Hynobius nigrescens*. A los 6 meses de tratamiento se encontraron células foliculares que poseían un RER muy desarrollado y dilatado, numerosos gránulos y vacuolas, y las microvellosidades apicales más evidentes que en las células de ejemplares controles (ver Fox, 1983). Resultados similares fueron encontrados por Coleman *et al.* (1957) en las células foliculares de larvas de *Xenopus laevis* mantenidas en goitrógeno. Todas estas alteraciones morfológicas de las células foliculares, que nosotros hemos encontrado también en *Bufo arenarum* (tanto a los 3 como a los 5 meses de tratamiento), han sido explicadas en respuesta a una sobrestimulación por hipersecreción de tirotrofina.

Los resultados obtenidos en las larvas mantenidas en sustancias goitrógenas, pueden interpretarse en términos de mecanismos regulatorios del tipo feedback, involucrando los mínimos niveles de hormonas tiroideas en circulación y la elevada estimulación del eje hipotálamo-hipófisis sobre la glándula tiroides.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES.

- 1.- Las larvas de *Bufo arenarum*, crecen significativamente durante la pre- y prometamorfosis, siendo la reabsorción de la cola el principal acontecimiento responsable de la disminución de tamaño observada durante el clímax.
- 2.- El crecimiento de la pars distalis y de las tiroides ocurre en forma paralela al crecimiento larvario durante la pre- y prometamorfosis. Siendo también general la disminución del tamaño de estas glándulas durante el clímax metamórfico.
- 3.- La inmunorreacción generalizada en todos los estadios estudiados a los anticuerpos anti-TSH, anti-PRL, anti-GH, anti-ACTH humanos implica una gran similitud antigénica entre estos anticuerpos y las hormonas correspondientes de *Bufo arenarum*.
- 4.- La presencia de células inmunorreactivas a los distintos anticuerpos utilizados a comienzos de la premetamorfosis parece indicar que la diferenciación morfofuncional de las células de la pars distalis tiene lugar al final del período embrionario, coincidiendo con la reorganización que originará la separación entre la pars distalis y la pars intermedia.
- 5.- Durante el crecimiento larval de *Bufo arenarum*, (pre-prometamorfosis) hay un período de proliferación celular y almacenamiento de hormonas hipofisarias, y un segundo

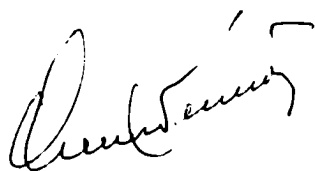
período de liberación hormonal hacia la mitad del clímax metamórfico, caracterizado especialmente por un elevado nivel de hormonas tiroideas, adrenales y de prolactina.

6.- En *Bufo arenarum*, la máxima liberación de tirotrofina ocurriría entre los estadios XV y XVII (fin de la prometamorfosis y mitad del clímax) y el pico de liberación de hormonas tiroideas entre los estadios XVII y XX (mitad y final del clímax). El retardo existente entre la liberación de tirotrofina y el incremento plasmático de los niveles de hormonas tiroideas a mediados del clímax podrían reflejar el tiempo que necesita la maquinaria de biosíntesis y liberación de hormonas tiroideas para actuar después de la estimulación por tirotrofina.

7.- Larvas de *Bufo arenarum*, mantenidas en el goitrógeno perclorato de potasio después de la eclosión, no son capaces de superar el estadio VIII de la metamorfosis. El detenimiento en el desarrollo no impide el crecimiento larval, obteniéndose ejemplares que a los 5 meses de tratamiento alcanzan los 40 mm de longitud y más de 1 g de peso.

8.- El notable incremento en los volúmenes de las glándulas tiroideas y de la pars distalis, como el gran desarrollo y evolución de las células TSH, PRL, y en menor proporción de las células GH y ACTH hipofisarias, serían el

resultado de mecanismos regulatorios del tipo feedback, que involucran los mínimos niveles de hormonas tiroideas en circulación y la elevada estimulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. Este control podría ser directo sobre la pars distalis hipofisaria, o indirecto, por aumento de TRH u otro factor hipotalámico.



DR. A. PISANO
DIRECTOR LABORATORIO
INVESTIGACIONES EMBRIOLÓGICAS
(CONICET)



.....

Lic. Leandro A. Miranda

TABLAS

TABLA I. Longitud total (LTO), corporal (LCU), caudal (LCO) y peso húmedo de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Se representan los valores medios $\pm$ los errores estándares, *P<0,05 respecto del estadio anterior. (N= 15)

ESTADIO	LTO (mm)	LCU (mm)	LCO (mm)	PESO (g)
IV	14,7 $\pm$ 0,95	6,2 $\pm$ 0,34	8,5 $\pm$ 1,05	0,04 $\pm$ 0,01
VIII	30,7 $\pm$ 1,71*	12,4 $\pm$ 0,61*	18,3 $\pm$ 1,23*	0,29 $\pm$ 0,02*
XII	35,4 $\pm$ 1,32	14,3 $\pm$ 0,98	21,1 $\pm$ 0,92	0,36 $\pm$ 0,04*
XV	37,6 $\pm$ 0,97	17,3 $\pm$ 1,06	20,3 $\pm$ 1,68	0,40 $\pm$ 0,01
XVII	28,5 $\pm$ 1,23*	13,2 $\pm$ 0,86*	15,3 $\pm$ 0,84*	0,35 $\pm$ 0,05*
XX	14,5 $\pm$ 0,79*	14,5 $\pm$ 0,32		0,30 $\pm$ 0,04*
POSTM.	18,5 $\pm$ 0,97*	18,5 $\pm$ 0,45*		0,40 $\pm$ 0,03*

TABLA II. Volumen de la pars distalis de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Se representan valores medios $\pm$ los errores estándares, *P<0,05 respecto del estadio anterior. (N=5)

ESTADIO	VOLUMEN PARS DISTALIS ($\mu\text{m}^3 \times 10^6$)
IV	0,69 $\pm$ 0,03
VIII	1,32 $\pm$ 0,05*
XII	2,72 $\pm$ 0,17*
XV	3,17 $\pm$ 0,13
XVII	2,47 $\pm$ 0,17*
XX	2,05 $\pm$ 0,13
POSTM.	1,64 $\pm$ 0,08*

TABLA III. Número de células inmunorreactivas TSH, PRL, GH y ACTH en la hipófisis de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Se representan valores medios $\pm$ los errores estándares, *P<0,05 respecto del estadio anterior. (N=5)

ESTADIO	CELULAS TSH	CELULAS PRL	CELULAS GH	CELULAS ACTH
IV	15,73 $\pm$ 1,67	27,50 $\pm$ 2,49	15,33 $\pm$ 1,26	14,14 $\pm$ 1,56
VIII	26,25 $\pm$ 2,20*	34,89 $\pm$ 1,90*	27,56 $\pm$ 1,96*	14,75 $\pm$ 1,73
XII	41,29 $\pm$ 4,73*	44,00 $\pm$ 4,04*	60,71 $\pm$ 4,39*	23,12 $\pm$ 1,14*
XV	54,00 $\pm$ 3,01*	47,31 $\pm$ 2,93	54,30 $\pm$ 3,60	32,44 $\pm$ 4,22*
XVII	36,43 $\pm$ 2,29*	50,40 $\pm$ 3,68	39,69 $\pm$ 2,35*	31,91 $\pm$ 2,79
XX	29,56 $\pm$ 3,24	34,45 $\pm$ 2,20*	35,40 $\pm$ 4,07	33,90 $\pm$ 3,7
POSTM.	25,10 $\pm$ 2,26	49,00 $\pm$ 4,39*	36,80 $\pm$ 4,81	43,23 $\pm$ 3,05*

TABLA IV. Densidad de volumen (Vv) de las células inmunorreactivas TSH, PRL, GH y ACTH, en la hipófisis de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Se representan valores medios $\pm$ los errores estándares, *P<0,05 respecto del estadio anterior. (N=5)

ESTADIO	Vv CELULAS TSH	Vv CELULAS PRL	Vv CELULAS GH	Vv CELULAS ACTH
IV	0,17 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,01
VIII	0,19 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,01
XII	0,19 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01
XV	0,22 $\pm$ 0,01*	0,25 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,01
XVII	0,16 $\pm$ 0,02*	0,29 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01
XX	0,12 $\pm$ 0,02*	0,21 $\pm$ 0,02*	0,14 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,02*
POSTM.	0,10 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,02

TABLA V. Volumen total ocupado (V) por las células inmunorreactivas TSH, PRL, GH y ACTH, en la hipófisis de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Se representan valores medios $\pm$ los errores estándares, *P<0,05 respecto del estadio anterior. (N=5)

ESTADIO	V CELULAS TSH ($\mu^3 \times 10^6$)	V CELULAS PRL ($\mu^3 \times 10^6$)	V CELULAS GH ($\mu^3 \times 10^6$)	V CELULAS ACTH ($\mu^3 \times 10^6$)
IV	0,13 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01
VIII	0,25 $\pm$ 0,03*	0,29 $\pm$ 0,03*	0,21 $\pm$ 0,02*	0,14 $\pm$ 0,01
XII	0,45 $\pm$ 0,04*	0,57 $\pm$ 0,05*	0,48 $\pm$ 0,01*	0,25 $\pm$ 0,01
XV	0,62 $\pm$ 0,02*	0,79 $\pm$ 0,08	0,49 $\pm$ 0,04	0,37 $\pm$ 0,02
XVII	0,42 $\pm$ 0,02*	0,76 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,03*	0,27 $\pm$ 0,02
XX	0,26 $\pm$ 0,03*	0,35 $\pm$ 0,03*	0,27 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,02
POSTM.	0,19 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,02*	0,26 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,03

TABLA VI. Volumen glándulas tiroides (VGT), número de folículos (NF), diámetro máximo folicular (DMF) y altura de las células (ACF) foliculares de las glándulas tiroides de *Bufo arenarum* durante el desarrollo. Se representan valores medios $\pm$ los errores estándares, *P<0,05 respecto del estadio anterior. (N=5)

ESTADIO	VGT ($\mu\text{m}^3 \times 10^6$)	NF	DMF (μm)	ACF (μm)
IV	0,45 $\pm$ 0,01	3,3 $\pm$ 0,30	28,5 $\pm$ 0,40	4,5 $\pm$ 0,70
VIII	0,89 $\pm$ 0,03*	5,0 $\pm$ 0,60	35,2 $\pm$ 1,70*	8,3 $\pm$ 0,60*
XII	3,10 $\pm$ 0,13*	5,3 $\pm$ 0,70	86,4 $\pm$ 11,1*	9,1 $\pm$ 0,70
XV	5,79 $\pm$ 0,11*	9,3 $\pm$ 0,70*	96,7 $\pm$ 9,60	10,1 $\pm$ 0,60
XVII	2,60 $\pm$ 0,08*	13,0 $\pm$ 0,60*	39,7 $\pm$ 1,30*	12,3 $\pm$ 0,60
XX	1,98 $\pm$ 0,03*	9,0 $\pm$ 0,60*	34,1 $\pm$ 2,79	5,1 $\pm$ 0,70*
POSTM.	3,32 $\pm$ 0,07*	8,7 $\pm$ 0,70	44,2 $\pm$ 1,10*	5,1 $\pm$ 0,70

TABLA VII. Estadios metamórficos de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO_4 , A: 0,034 % B: 0,051 % C: CONTROL. Se representan valores medios semanales $\pm$ los errores estándares. Diferencias significativas entre grupos, * $P < 0,05$ (N=15).

SEMANA	ESTADIO		
	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C
0	3,3 $\pm$ 0,48	3,4 $\pm$ 0,52	3,3 $\pm$ 0,52
1	4,0 $\pm$ 0,00	3,8 $\pm$ 0,42	3,9 $\pm$ 0,32
2	4,4 $\pm$ 0,53	4,0 $\pm$ 0,00	4,0 $\pm$ 0,23
3	5,0 $\pm$ 0,00	4,8 $\pm$ 0,42	5,2 $\pm$ 0,42
4	5,7 $\pm$ 0,48	5,4 $\pm$ 0,52	6,0 $\pm$ 0,29
5	6,0 $\pm$ 0,00	5,6 $\pm$ 0,53	6,9 $\pm$ 0,32
6	6,4 $\pm$ 0,52	6,0 $\pm$ 0,22	7,7 $\pm$ 0,48
7	6,5 $\pm$ 0,53	6,0 $\pm$ 0,31	9,5 $\pm$ 0,53
8	6,7 $\pm$ 0,48	6,0 $\pm$ 0,11	10,3 $\pm$ 0,48*
9	6,8 $\pm$ 0,42	6,1 $\pm$ 0,11	12,4 $\pm$ 0,97*
10	7,1 $\pm$ 0,32	6,4 $\pm$ 0,52	14,7 $\pm$ 0,48*
11	7,7 $\pm$ 0,48	7,3 $\pm$ 0,48	19,2 $\pm$ 0,42*
12	8,0 $\pm$ 0,00	7,3 $\pm$ 0,48	20,0 $\pm$ 0,42*
13	8,0 $\pm$ 0,00	8,0 $\pm$ 0,00	
14	8,0 $\pm$ 0,00	8,0 $\pm$ 0,00	
15	8,0 $\pm$ 0,00	8,0 $\pm$ 0,00	
16	8,0 $\pm$ 0,00	8,0 $\pm$ 0,00	
17	8,0 $\pm$ 0,00	8,0 $\pm$ 0,00	
18	8,0 $\pm$ 0,00	8,0 $\pm$ 0,00	
19	8,0 $\pm$ 0,00	8,0 $\pm$ 0,00	
20	8,0 $\pm$ 0,00	8,0 $\pm$ 0,00	

TABLA VIII. Longitud total de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de $KClO_4$, A: 0,034 % B: 0,051 % C: CONTROL. Se representan valores medios semanales $\pm$ los errores estándares. Diferencias significativas entre grupos, * $P < 0,05$ (N=15).

SEMANA	LONGITUD TOTAL (mm)		
	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C
0	13,3 $\pm$ 0,48	13,4 $\pm$ 0,52	13,4 $\pm$ 0,52
1	14,4 $\pm$ 0,52	14,1 $\pm$ 0,67	14,4 $\pm$ 0,47
2	16,5 $\pm$ 0,71	15,5 $\pm$ 0,53	14,7 $\pm$ 0,95
3	21,9 $\pm$ 1,23	18,4 $\pm$ 2,01	19,8 $\pm$ 0,52
4	23,5 $\pm$ 0,85	23,3 $\pm$ 2,87	22,6 $\pm$ 1,75
5	25,2 $\pm$ 1,03	24,9 $\pm$ 2,47	26,4 $\pm$ 0,71
6	28,9 $\pm$ 2,23	29,4 $\pm$ 0,97	30,7 $\pm$ 1,71
7	30,8 $\pm$ 2,97	31,3 $\pm$ 1,25	30,5 $\pm$ 0,48
8	32,5 $\pm$ 1,95	31,7 $\pm$ 1,64	31,8 $\pm$ 0,53
9	32,5 $\pm$ 1,98	33,4 $\pm$ 0,97	35,4 $\pm$ 1,32
10	34,8 $\pm$ 2,72	35,2 $\pm$ 1,69	35,4 $\pm$ 0,97
11	37,2 $\pm$ 1,75	38,2 $\pm$ 0,97	16,2 $\pm$ 0,97*
12	40,2 $\pm$ 1,75	40,6 $\pm$ 0,97	14,5 $\pm$ 0,79*
13	43,3 $\pm$ 1,93	42,6 $\pm$ 1,12	
14	45,8 $\pm$ 1,43	44,9 $\pm$ 1,23	
15	48,2 $\pm$ 1,56	49,2 $\pm$ 1,65	
16	50,2 $\pm$ 1,89	51,2 $\pm$ 1,09	
17	53,8 $\pm$ 1,23	54,2 $\pm$ 1,78	
18	55,6 $\pm$ 2,13	55,9 $\pm$ 2,34	
19	59,1 $\pm$ 2,11	58,1 $\pm$ 2,12	
20	63,8 $\pm$ 2,21	63,5 $\pm$ 2,54	

TABLA IX. Peso húmedo de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO₄, A: 0,034 % B: 0,051 % C: CONTROL. Se representan valores medios semanales $\pm$ los errores estándares. Diferencias significativas entre grupos, *P<0,05 (N=15).

SEMANA	PESO (g)		
	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C
0	0,04 $\pm$ 0,001	0,03 $\pm$ 0,001	0,03 $\pm$ 0,001
1	0,04 $\pm$ 0,001	0,04 $\pm$ 0,001	0,03 $\pm$ 0,001
2	0,06 $\pm$ 0,001	0,05 $\pm$ 0,001	0,04 $\pm$ 0,001
3	0,12 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01
4	0,16 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,03
5	0,21 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,03
6	0,33 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,01
7	0,42 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,02*
8	0,51 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,04	0,34 $\pm$ 0,01*
9	0,61 $\pm$ 0,06	0,60 $\pm$ 0,05	0,36 $\pm$ 0,04*
10	0,73 $\pm$ 0,04	0,71 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,05*
11	0,84 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,02*
12	0,98 $\pm$ 0,03	0,97 $\pm$ 0,04	0,30 $\pm$ 0,03*
13	0,99 $\pm$ 0,02	1,00 $\pm$ 0,05	
14	1,00 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,04	
15	1,00 $\pm$ 0,05	1,05 $\pm$ 0,05	
16	1,00 $\pm$ 0,03	1,05 $\pm$ 0,03	
17	1,05 $\pm$ 0,06	1,10 $\pm$ 0,03	
18	1,10 $\pm$ 0,06	1,10 $\pm$ 0,06	
19	1,10 $\pm$ 0,02	1,12 $\pm$ 0,03	
20	1,10 $\pm$ 0,03	1,14 $\pm$ 0,05	

TABLA X. Volumen de la pars distalis de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO₄ (0,034 %) durante 3 y 5 meses. Los valores identificados con la misma letra no difieren significativamente, P<0,05. Se representan valores medios $\pm$ los errores estándares. (N=5)

MESES	VOLUMEN TIROIDES ($\mu\text{m}^3 \times 10^6$)	VOLUMEN PARS DISTALIS ($\mu\text{m}^3 \times 10^6$)
CONTROL	0,89 $\pm$ 0,03a	1,32 $\pm$ 0,05a
3	7,47 $\pm$ 1,34b	7,84 $\pm$ 0,70b
5	12,36 $\pm$ 0,85c	13,91 $\pm$ 0,70c

TABLA XI. Número de células inmunorreactivas TSH, PRL, GH y ACTH en la hipófisis de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO₄ (0,034 %) durante 3 y 5 meses. Para cada tipo celular los valores identificados con la misma letra no difieren significativamente, P<0,05. Se representan valores medios $\pm$ los errores estándares. (N=5)

MESES	CELULAS TSH	CELULAS PRL	CELULAS GH	CELULAS ACTH
CONTROL	26,25 $\pm$ 2,20a	34,89 $\pm$ 1,90a	27,56 $\pm$ 1,96a	14,75 $\pm$ 1,73a
3	128,28 $\pm$ 4,14b	124,45 $\pm$ 3,91b	47,22 $\pm$ 1,92b	29,93 $\pm$ 2,78b
5	202,81 $\pm$ 7,91c	224,83 $\pm$ 4,38c	75,61 $\pm$ 4,06c	41,32 $\pm$ 2,20b

TABLA XII. Densidad de volumen (Vv) de las células inmunnorreactivas TSH, PRL, GH y ACTH de la hipófisis de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO₄ (0,034 %) durante 3 y 5 meses. Para cada tipo celular los valores identificados con la misma letra no difieren significativamente, P<0,05. Se representan valores medios $\pm$ los errores estándares. (N=5)

MESES	Vv CELULAS TSH	Vv CELULAS PRL	Vv CELULAS GH	Vv CELULAS ACTH
Control	0,19 $\pm$ 0,02a	0,20 $\pm$ 0,01a	0,18 $\pm$ 0,02a	14,75 $\pm$ 1,73a
3	0,27 $\pm$ 0,03a	0,25 $\pm$ 0,02a	0,13 $\pm$ 0,01ab	29,93 $\pm$ 2,78a
5	0,40 $\pm$ 0,05b	0,44 $\pm$ 0,01b	0,10 $\pm$ 0,01b	41,32 $\pm$ 2,20a

TABLA XIII. Volumen total ocupado (V) por las células inmunorreactivas TSH, PRL, GH y ACTH de la hipófisis de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO₄ (0,034 %). Para cada tipo celular los valores identificados con la misma letra no difieren significativamente, P<0,05. Se representan valores medios $\pm$ los errores estándares. (N=5)

MESES	V CELULAS TSH ($\mu\text{m}^3 \times 10^6$)	V CELULAS PRL ($\mu\text{m}^3 \times 10^6$)	V CELULAS GH ($\mu\text{m}^3 \times 10^6$)	V CELULAS ACTH ($\mu\text{m}^3 \times 10^6$)
CONTROL	0,25 $\pm$ 0,03a	0,29 $\pm$ 0,03a	0,21 $\pm$ 0,02a	0,14 $\pm$ 0,01a
3	1,79 $\pm$ 0,20a	1,59 $\pm$ 0,20a	1,12 $\pm$ 0,21ab	0,61 $\pm$ 0,06a
5	4,61 $\pm$ 0,52b	5,31 $\pm$ 0,51b	1,47 $\pm$ 0,20b	1,26 $\pm$ 0,16b

TABLA XIV. Volumen de las glándulas tiroides y altura de las células foliculares tiroideas de larvas de *Bufo arenarum* mantenidas en solución de KClO₄ (0,034 %) durante 3 y 5 meses. Los valores identificados con la misma letra no difieren significativamente, P<0,05. Se representan valores medios $\pm$ los errores estándares. (N=5)

MESES	VOLUMEN TIROIDES ($\mu\text{m}^3 \times 10^6$)	ALTURA CELULAS FOLICULARES (μm)
CONTROL	0,89 $\pm$ 0,03a	8,33 $\pm$ 0,63a
3	7,47 $\pm$ 1,34b	17,12 $\pm$ 1,94b
5	12,36 $\pm$ 0,85c	22,87 $\pm$ 2,03c

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- ALER, G.M. (1970). Prolactin cells: study on the pituitary gland of the roach (*Leuciscus rutilus*) by immunohistochemical methods. *Acta Zool.*, 51:149-157.
- ALLEN, B.M. (1916). Extirpation experiments in *Rana pipiens* larvae. *Science*, 44:755-757.
- ALLEN, B.M. (1918). The results of thyroid removal in the larvae of *Rana pipiens*. *J. Exp. Zool.*, 24:499-519.
- ALLEN, B.M. (1920). Experiments on the transplantation of the hypophysis of adult *Rana pipiens* to tadpoles. *Science*, 52:274-276.
- BAKER, B.S. and TATA, J.R. (1990). Accumulation of protooncogene *c-erb-A* related transcripts during *Xenopus* development: association with early acquisition of response to thyroid hormone and estrogen. *EMBO J.*, 9: 879-885.
- BALLS, M.; CLOTHIER, R.H.; ROWLES, J.M.; KITELEY, N.A. and BENNETT, G.W. (1985). TRH distribution, levels, and significance during the development of *Xenopus laevis*. In: *Metamorphosis* (M. Balls and M. Bownes, eds.), pp. 260-272. Clarendon Press, Oxford.
- BARTHOLOMEW, G.A. (1977). Energy metabolism. In: *Animal Physiology, principle and adaptation*. (M.C. Gordon, ed), pp. 345-359. Mac Millan, New York.
- BERMAN, R.; BERN, H.A.; NICOLL, C.S. and STROHMAN, R.C. (1964). Growth promoting effects of mammalian prolactin and growth hormone in tadpoles of *Rana catesbeiana*. *J. Exp. Zool.*, 156: 353-360.
- BERN, H.A.; NICOLL, C.S. and STROHMAN, R.C. (1967). Prolactin and tadpole growth. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 126: 518-520.
- BERN, H.A. (1975). Prolactin and osmoregulation. *Amer. Zool.*, 15: 937-948.
- BERN, H.A. (1983). Functional evolution of prolactin and growth hormone in lower vertebrates. *Amer. Zool.*, 23: 663-671.
- BILLARD, R.; BRETON, B. et DUBOIS, M.P. (1971). Immunocytiologie et histochimie des cellules gonadotropes et histochimie des cellules gonadotropes et thyreotropes hypophysaires chez la carpe *Cyprinus carpio*. *C.R. Acad Sc. Paris*, 272: 981-983.

- BRAY, T. and SICARD, R.E. (1982). Correlation among the changes in the levels of thyroid hormones, thyrotropin and thyrotropin releasing hormone during the development of *Xenopus laevis*. *Exp. Cell Biol.* 50: 101-107.
- BROWN, P.S. and FRYE, B.C. (1969). Effects of hypophysectomy, prolactin, and growth hormone on growth in postmetamorphic frogs. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 13: 139-145.
- CAMBAR, R. et MARROT, B.R. (1954). Table chronologique du developpement de la grenouille agile (*Rana dalmatica bon*). *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 88: 168-177.
- CAMBAR, R. et GIPOULOUX, J.D. (1956). Table chronologique du développement embryonnaire et larvaire du crapaud commun: *Bufo bufo* L. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 90: 198-217.
- CAMPANTICO, E.; OLIVERO, M. e PEYROT, A. (1968). Accrescimento corpore e metabolismo dello iodio in larve di *Bufo bufo* trattate con prolactina: studio con I^{125} . *Ric. Sic.*, 38: 980-985.
- CAMPANTICO, E.; GUASTALLA, A. and PATRIARCA, E. (1985a). Identification by immunofluorescence of prolactin- and somatotrophin-producing cells in the pituitary gland of the tree frog *Hyla arborea*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 57: 110-116.
- CAMPANTICO, E.; GUASTALLA, A. and PATRIARCA, E. (1985b). Identification by immunofluorescence of ACTH-producing cells in the pituitary gland of the tree frog *Hyla arborea*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 59: 192-198.
- CLEMONS, G.K. and NICOLL, C.S. (1977a). Effects of antisera to bullfrog prolactin and growth hormone on metamorphosis of *Rana catesbeiana* tadpoles. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 31: 495-497.
- CLEMONS, G.K. and NICOLL, C.S. (1977b). Development and preliminary application of a homologous radioimmunoassay for bullfrog prolactin. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 32: 531-535.
- COLEMAN, R.; EVENNETT, P.J. and DODD, J.M. (1957). The ultrastructural localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase and adenosine triphosphatase in induced goitres of *Xenopus laevis* Daudin tadpoles. *Histochemie.*, 10: 33-43.
- COLEMAN, R.; EVENNETT, P.J. and DODD, J.M. (1968). Ultrastructural observations on the thyroid gland of *Xenopus laevis* Daudin throughout metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 10: 34-46.

- COLLINS, J.P. (1979). Intrapopulation variation in the body size at metamorphosis and timing of metamorphosis in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Ecology*, 60: 738-749.
- COONS, A.H.; CREECH, H.J.; JONES, R.N. and BERLINER, E. (1942). The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.*, 45: 159-170.
- CORDIER, R. (1953a). L'hypophyse de *Xenopus*. Interprétation histophysiologique. *Ann. Soc. R. Zool. Belg.*, 84: 5-16.
- CORDIER, R. (1953b). Cytologie hypophysaire et signification fonctionnelle chez l'Amphibien *Xenopus*. *C. R. Ass. Anat.*, 79:484-490.
- DAINTON, B. (1988). Cold tolerance and thyroid activity in developing tadpoles of *Xenopus laevis*. *Journal of Herpetology*. 22: 301-306.
- D'ANGELO, S.A. (1941). An analysis of the morphology of the pituitary and thyroid glands in amphibian metamorphosis. *Amer. J. Anat.*, 69: 407-437.
- DARRAS, V.M. and KÜHN, E.R. (1982). Increased plasma levels of thyroid hormones in a frog *Rana ridibunda* following intravenous administration of TRH. *Gen. Comp. Endocrinol.* 48: 469-475.
- DASH, M.C. and HOTA, A.K. (1980). Density effects on the survival growth and metamorphosis of *Rana tigrina* tadpoles. *Ecology*, 61: 1025-1028.
- DELESSE, M.A. (1847). Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. *C.R. Acad. Sci. Paris*. 25: 544.
- DENVER, R. and LICHT, P. (1989). Neuropeptide stimulation of thyrotropin secretion in the larval bullfrog: Evidence for a common neuroregulator of thyroid and interrenal activity in metamorphosis. *J. Exp. Zool.* 252: 101-104.
- DISCLOS, P. et REMY, C. (1974). Etude par immunofluorescence d'hypophyses greffées dans le 3e ventricule chez les têtards d'*Alytes obstetricans* (Laur). *Recherches des cellules somatotropes et des cellules à prolactine. J. Physiol. Paris.*, 68: 58.
- DODD, M.H.I. and DODD, J.M. (1976). The biology of metamorphosis. In: *Physiology of the amphibia*. (B. Lofts, ed.), Vol. 3, pp. 467-599. Acad. Press, New York.
- DOERR-SCHOTT, J. (1968a). Cytologie et cytophysiologie de l'adenohypophyse des amphibiens. *Ann. Biol.*, 7: 189-225.

- DOERR-SCHOTT, J. (1968b). Developpment de l'hypophyse de *Rana temporaria*. Etude au microscope electronique. Z. Zellforsch., 90: 616-645.
- DOERR-SCHOTT, J. (1971). Etude comparative des résultats cytologiques, histochimiques, cytophysiologiques et ultras-structuraux enregistrés par différents auteurs dans l'hypophyse distale des Amphibiens. Ann. endocr. Paris, 32: 371-379.
- DOERR-SCHOTT, J. (1972). Les cellules corticotropes de l'hypophyse d'un amphibien apres interrenalectomie. Etude cytoimmunologique et ultrastructurale. Z. Zellforsch., 132: 333-346.
- DOERR-SCHOTT, J. et DUBOIS, M.P. (1972a). Mise en evidence par immunofluorescence des cellules corticotropes de l'hypophyse des amphibiens. Gen. Comp. Endocrinol., 18: 587-588.
- DOERR-SCHOTT, J. et DUBOIS, M.P. (1972b). Identification par immunofluorescence des cellules corticotropes et mélanotropes de l'hypophyse des amphibiens. Z. Zellforsch., 132: 323-331.
- DOERR-SCHOTT, J. et DUBOIS, M.P. (1972c). Identification par immunofluorescence des cellules thyroïdiques et gonadotropes de l'hypophyse d'un amphibien anoure: *Xenopus laevis*. C.R. Acad. Sc. Paris, 275: 1515-1518.
- DOERR-SCHOTT, J. et DUBOIS, M.P. (1973a). Mise en évidence des hormones de l'hypophyse d'un amphibien par la cytoimmunoenzymologie au microscope electronique. C.R. Acad. Sc. Paris, 276: 2179-2182.
- DOERR-SCHOTT, J. and DUBOIS, M.P. (1973b). Detection par immunofluorescence des cellules corticotropes et mélanotropes dans l'hypophyse de la grenouille *Rana temporaria* L, au cours du developpement. Z. Zellforsch., 142: 571-580.
- DOERR-SCHOTT, J. (1974a). Cyto-Immunochemical study of the hypophysial cells of amphibians by light-and electron-microscopy. Fortsch. Zool., 246-267.
- DOERR-SCHOTT, J. (1974b). Localisation submicroscope par cytoimmunoenzymologie de differents principes hormonaux de l'hypophyse de *Rana temporaria* L. J. Microsc. Paris, 20: 151-164.
- DOERR-SCHOTT, J. (1976). Immunohistochemical detection, by light and electron microscopy, of pituitary hormones in cold-blooded vertebrates. Gen. Comp. Endocrinol., 28: 513-529.

- DOERR-SCHOOT, J. (1980). Immunohistochemistry of the adenohipophysis of non-mammalian vertebrates. *Acta Histochem.*, 22: 185-223.
- DOERR-SCHOOT, J. and ZUBER-VOGELI, M. (1984). Immunohistochemical study of the adenohipophysis of *Typhlonectes compressicaudus* (Amphibia, gymnophiona). *Cell. tissue Res.*, 235: 211-214.
- DUPONT, W. and VAUDRY, H. (1974). Immunofluorescence studies of the corticotropic cells in normal and various experimental frogs. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 22:365.
- ECHEVARRIA, D.D. y FIORITO DE LOPEZ, L.E. (1981). Estadios de la metamorfosis de *Bufo arenarum* (ANURA). *Physis* (Buenos Aires), Secc. B, 40 (98): 15-23.
- EDDY, L. and LIPNER, H. (1975). Acceleration of thyroxine-induced metamorphosis by prolactin antiserum. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 25: 462-466.
- EICHLER, V.B. and GRAY, L.S. (1976). The influence of invorenmental lighting on the growth and prometamorphic development of larval *Rana pipiens*. *Develop. Growth and Differ.*, 18: 177-182.
- EMMART, E.W.; PICKFORD, G.E. and WILHELM, A.E. (1966). Localization of prolactin within the pituitary of a cyprinidont fish *Fundulus heteroclitus* (linnaeus). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 7: 571-583.
- EMMART, E.W. (1969). The localization of endogenous "prolactin" in the pituitary gland of the goldfish, *Carassius auratus* linnaeus. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 12: 519-525.
- ENEMAR, A.; ESSVIK, B. and KLANG, R. (1968). Growth-promoting effects of ovine somatotropin and prolactin in tadpoles of *Rana temporaria*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 11: 328-331.
- ENEMAR, A. (1978). Adenohipophysis and growth in tadpoles of *Rana temporaria*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 34: 211-218.
- ETKIN, W. (1964). Metamorphosis. In: *Physiology of the amphibia* (J.A. Moore, ed.), pp. 427-468. Academic press, New York.
- ETKIN, W. and GONA, A.G. (1967). Antagonism between prolactin and thyroid hormone in amphibian development. *J. Exp. Zool.*, 165: 148-258.

- ETKIN, W. (1968). Hormonal control of amphibian metamorphosis. In: Metamorphosis: A problem in development biology. (W. Etkin, L.I. Gilbert, eds.), pp. 313-348. Appleton, New York.
- ETKIN, W. and KIM, Y.S. (1971). Effects of TRH on tadpole tissue. Amer. Zool. 11: 654 (abstract).
- ETKIN, W. and GONA, A.G. (1974). Evolution of thyroid function in poikilothermic vertebrates. In: Handbook of Physiology. (Williams and Wilkins, eds.), pp. 5-20. Baltimore.
- FONTAINE, Y.A. (1984). Las hormonas y la evolución. Mundo Científico, 36: 540-552.
- FOX, H. (1983). Amphibian morphogenesis. Humana press, New Jersey.
- FRIEDEN, E. (1963). The chemistry of amphibian metamorphosis. Scien. Amer., 170: 2-9.
- FRIEDEN, E. and JUST, J.J. (1970). Hormonal responses in amphibian metamorphosis. In: Actions of hormones on molecular processes. (G. Litwack, ed.) Vol. 1, pp. 1-53. Academic Press, New York.
- FRYE, B.E.; BROWN, P.S. and SNYDER, B.W. (1972). Effects of prolactin and somatotropin on growth and metamorphosis of amphibians. Gen. Comp. Endocrinol., 3: 209-218.
- GALTON, V.A.; COHEN, J.S. and MUNCK, K. (1982). T₄ '5-monodeiodinase: The acquisition and significance of this enzyme system in the developing *Rana catesbeiana* tadpole. In: Phylogenetic aspects of thyroid hormones. (S. Suzuki, ed.), pp: 75-90. Center Acad. Publ. Japan, Tokyo.
- GANCEDO, B.; CORPAS, I.; ALONSO GOMEZ, A.L.; MORREALE DE ESCOBAR, G. and ALONSO BEDATE, M. (1992). Corticotropin-releasing factor stimulates metamorphosis and increases thyroid hormone concentration in prometamorphic *Rana perezi* larvae. Gen. Comp. Endocrinol., 87: 6-13.
- GARCIA-NAVARRO, S.; MALAGON, M.M. and GRACIA-NAVARRO, F. (1988a). Immunohistochemical localization of thyrotropic cells during amphibian morphogenesis: A stereological study. Gen. Comp. Endocrinol., 71: 116-123.
- GARCIA-NAVARRO, S.; MALAGON, M.M.; GARCIA-HERDUGO, G. and GRACIA-NAVARRO, F. (1988b). Immunocytochemical and morphometric study of prolactin cells during amphibian morphogenesis. Gen. Comp. Endocrinol., 69: 188-196.

- GIROD, C. (1983). The adenohipophysis of amphibians. In: Immunocytochemistry of the vertebrate adenohipophysis. pp: 83-106. G. Fischer Verlag, Stuttgart-New York.
- GONA, A.G. (1967). Prolactin as a goitrogenic agent in amphibia. *Endocrinol.*, 81: 748-754.
- GONA, A.G. (1968). Radioiodine studies on prolactin action in tadpoles. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 11: 278-283.
- GOOS, H.J.Th. (1968). Hypothalamic neurosecretion and metamorphosis in *Xenopus laevis*. III. The effect of an interruption of thyroid hormone synthesis. *Z. Zellforsch.* 92: 585-587.
- GOOS, H.J.Th.; DE KNECHT, A.M. and DE VRIES, J. (1968a). Hypothalamic neurosecretion and metamorphosis in *Xenopus laevis*. I. The effect of propylthiouracil. *Z. Zellforsch.* 86: 384-392.
- GOOS, H.J.Th.; ZWANENBEEK, H.C.M. and VAN OORDT, P.G.W.J. (1968b). Hypothalamic neurosecretion and metamorphosis in *Xenopus laevis*. II. The effect of thyroxine following treatment with propylthiouracil. *Arch. Anat. Histol. Embryol.* 51, 269-274.
- GOOS, H.J.Th. (1969). Hypothalamic neurosecretion and metamorphosis in *Xenopus laevis*. IV. The effect of extirpation of the presumed TRF cells of a subsequent PTU treatment. *Z. Zellforsch.* 97: 449-458.
- GOOS, H.J.Th. (1978). Hypophysiotropic centers in the brain of amphibians and fish. *Amer. Zool.* 18: 401-410.
- GORBMAN, A.; DICKHOFF, W.W.; VIGNA, S.R.; CLARK, N.B. and RALPH, C.L. (1983). The pars distalis. In: *Comparative Endocrinology*. (J. Wiley, Ed.), pp. 117-157. New York.
- GOSNER, K.L. (1960). A simplified table of staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16: 183-190.
- GRACIA-NAVARRO, F. and DOERR-SCHOTT, J. (1982). Immunohistochemical detection of adenohipophyseal cells containing hormones in *Rana ridibunda*. *Cell Tissue Res.*, 222: 687-690.
- GRACIA-NAVARRO, F.; GARCIA-NAVARRO, S. y GARCIA HERDUGO, G. (1986). Adenohipófisis de anfibios: Aspectos morfofuncionales. *Acta Microscópica*, 9: 97-108.

- GRACIA-NAVARRO, F.; MALAGON, M.; GARCIA-NAVARRO, S.; RUIZ-NAVARRO, A. and CASTAÑO, J. (1990). Response of amphibian pituitary cells to thyrotropin-releasing hormone (TRH) stimulation. In: Progress in Zoology (W. Hanke, ed.), Vol. 38, Biology and Physiology of Amphibians, pp. 209-218. G. Fischer Verlag, Stuttgart-New York.
- GRAHAN, R.C. and KARNOVSKY, M.J. (1966). The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubes of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem., 14: 292-302.
- GREEN, J.D. (1947). Vessels and nerves of amphibian hypophyses (a study of the living circulation and of histology of the hypophysial vessels and nerves). Anat. Rec., 99: 21-54.
- GUARDABASSI, A. e LATTES, M.G. (1964). Accrescimento corporeo e processi di sviluppo in larve di *Bufo bufo* normali, timectomizzate e con quattro timi, allevate in acqua di fonte o trattate con 4-metil-2-tiouracile. Arch. Zool. Ital., 49: 57-74.
- GUASTALLA A.; CAMPANTICO, E.; BOTALLO, C. and GUARDABASSI, A. (1972). Body growth, development and the hypophysial cytology in hypothalamectomized and radiothyroidectomized *Bufo bufo* larvae. Boll. Zool., 39:63-70.
- GUASTALLA, A. and CAMPANTICO, E. (1974). Hypothalamic control over thyroid activity in *Bufo bufo* larvae. Rech. Biol. Cont., 4: 231-236.
- GUASTALLA, A. and CAMPANTICO, E. (1979). Effects of hypothalamectomy at two levels upon thyroid activity and development in *Bufo bufo* tadpoles. Monitore Zool. Ital., 13: 11-23.
- GUASTALLA, A. and CAMPANTICO, E. (1990). Differentiation of PRL, GH and ACTH cells during *Rana dalmatina* larval development. In: Progress in Zoology (W. Hanke, ed.), "Biology and Physiology of Amphibians", Vol. 38, pp. 155-165. G. Fischer Verlag, Stuttgart-New York.
- GUDERNATSCH, J.F. (1912). Feeding experiments on tadpoles. I. The influence of specific organs given as food on growth and differentiation. A contribution to the knowledge of organs with internal secretion. Wilhelm Roux Arch. entwicklungsmech. Organisme. 35: 457-483.
- GUDERNATSCH, J.F. (1914). Feeding experiments on tadpoles. II. A further contribution to the knowledge of organs of internal secretion. Amer. J. Anat. 15: 431-482.

- GUNESCH, K.D. (1974). Beeinflussung des fettstoffwechsels beim Krallenfrosch (*Xenopus laevis* Daudin) durch ACTH, Corticosteroide, und Insulin. Zool. Jahrb. Physiol. 78: 108-127.
- GUYETANT, R. (1964). Actions comparées de la lumière et de l'obscurité sur la croissance et la métamorphose de têtards de *Rana temporaria*. Ann. Sci. Univ. Besançon-Zool. Physiol., 19: 77-98.
- GUYETANT, R.; BUGNON, C.; FELLMANN, D. et BLOCH, B. (1977). Etude cytoimmunologique comparative des cellules à prolactine et des cellules à somatotrophine chez des têtards d' *Alytes obstetricans* (L) élevés en groupe ou isolés. C.R. Acad. Sc. Paris, 285: 559-562.
- HALL, T.; and CHADWICK, A. (1984). Effects of synthetic mammalian TRH, somatostatin and dopamine, on the secretion of prolactin and growth hormone from amphibians and reptilian pituitary glands incubated *in vitro*. J. Endocrinol., 102: 175-180.
- HANKE, W. and LEIST, K.H. (1971). The effect of ACTH and corticosteroids on carbohydrate metabolism during metamorphosis of *Xenopus laevis*. Gen. Comp. Endocrinol., 16: 137-148.
- HANKE, W. and NEUMANN, U. (1972). Carbohydrate metabolism in amphibia. Gen. Comp. Endocrinol., 3: 198-208.
- HEIMANN, P. (1966). Ultrastructure of human thyroid. A study of normal thyroid, untreated and treated diffuse toxic goitre. Acta Endocrinol., 53: (Supl. 110).
- HERMAN, L. (1960). An electron microscope study of the salamander thyroid during hormonal stimulation. J. Biophys. Biochem. Cytol., 7: 143-150.
- HOTA, A.K. and DASH, M.C. (1986). Growth and metamorphosis in anurans larvae: effect of diet and temperature. Alytes, 5: 165-172.
- HOUDRY, J. (1993). Passage to the terrestrial life in amphibians II. Endocrine determinism. Zool. Sci., 10: 887-902.
- HSU, C.Y.; YU, N.W. and LIANG, H.M. (1976). The changes of growth activities in pituitaries of tadpoles at different metamorphic stages. Gen. Comp. Endocrinol., 30: 424-431.
- IRIE, M. (1960). Electron microscopic observation on the various mammalian thyroid glands. Arch. Histol. Jap. 19: 39-74.

- JACOBS, G.F.M. and KÜHN, E.R. (1992). Thyroid hormone feedback regulation of the secretion of bioactive thyrotropin in the frog. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 88: 415-123.
- JAFFE, R.C. (1981). Plasma concentration of corticosterone during *Rana catesbeiana* tadpole metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 44: 314-318.
- JUST, J.J. (1972). Protein bound iodine and protein concentration in plasma and pericardial fluid of metamorphosing anuran tadpoles. *Physiol. Zool.*, 45: 143-152.
- KAYE, N.W. (1961). Interrelationships of the thyroid and pituitary in embryonic and premetamorphic stages of the frog, *Rana pipiens*. *Gen. Comp. Endocr.*, 1: 1-19.
- KERR, T. (1939). On the histology of the developing pituitary in the frog (*Rana temporaria*) and in the toad (*Bufo bufo*). *Proc. Zool. Soc. London*, 109: 167-180.
- KERR, T. (1965). Histology of the distal lobe of the pituitary of *Xenopus laevis* Daudin. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 5: 232-240.
- KERR, T. (1966). The development of the pituitary in *Xenopus laevis* Daudin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 6: 303-311.
- KIKUYAMA, S.; YAMAMOTO, K. and MAYUMI, M. (1980). Growth-promoting and antimetamorphic hormone in pituitary glands of bullfrogs. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 41: 212-216.
- KIKUYAMA, S.; YAMAMOTO, K.; SEKI, T.; NIKI, K. and YOSHIZATO, K. (1981). Corticoid and prolactin: Hormones influencing amphibian metamorphosis. 9th Int. Symp. Comp. Endocrinol., p. 42, (Abstract).
- KIKUYAMA, S.; NIKI, K.; MAYUMI, M.; SHIBAYAMA, R.; NISHIKAWA, M. and SHINTAKE, N. (1983a). Studies on corticoid action on the toad tadpole tail in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 52: 395-399.
- KIKUYAMA, S.; Suzuki, R.M.; Niki, K. and Yoshizato, K. (1983b). Thyroid hormone-adrenal corticoid interaction in the tadpole tail. In: *Current Problems in Thyroid Research*. (Ui N. et al. eds.), pp 202-205. Excerpta Medica, Amsterdam.
- KIKUYAMA, S.; ISHII, T.; KOBAYASHI, T. and YAMAMOTO, K. (1984). Effect of growth hormone-containing fraction obtained from bullfrog hypophyses on growth of *Xenopus* juveniles. *Proc. Japan Acad.*, 60:69-72.

- KIKUYAMA, S.; SUZUKI, R.M. and IWAMURO, S. (1986). Elevation of plasma aldosterone levels of tadpoles at metamorphic climax. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 63: 186-190.
- KING, J.A. and MILLAR, R.P. (1981). TRH, GH-RH, and LH-RH in metamorphosing *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 44:20-27.
- KRUG, E.C.; HONN, K.V.; BATTISTA, J. and NICOLL, C.S. (1978). Corticosteroid and thyroid hormone levels in serum of bullfrog tadpoles during development and metamorphosis. *Amer. Zool.*, 18: 214.
- KRUG, E.C.; HONN, K.V.; BATTISTA, J. and NICOLL, C.S. (1980). Effects of thyroxine and ACTH treatment on corticosteroid levels in serum of bullfrog tadpoles. *Amer. Zool.*, 20: 858.
- KRUG, E.C.; HONN, K.V.; BATTISTA, J. and NICOLL, C.S. (1983). Corticosteroids in serum of *Rana catesbeiana* during development and metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 52: 232-241.
- KÜHN, E.R.; KIKUYAMA, S.; YAMAMOTO, K. and DARRAS, V.M. (1985). In vivo release of prolactin in *Rana ridibunda* following an intravenous injection of thyrotropin-releasing-hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 60: 86-89.
- KURABUCHI, S.; TANAKA, S. and KIKUYAMA, S. (1992). Development of TSH cells in larval toad, *Bufo japonicus* during metamorphosis and their response to thyroxine and thiourea. *Int. Symp. on Amphibian Endocrinol.*, p. 26, (Abstract).
- LELOUP, J. et BUSCAGLIA, M. (1977). La triiodothyronine, hormone de la métamorphose des amphibiens. *C. R. Acad. Sci. Ser.*, 284: 2261-2263.
- LELOUP-HATEY, J.; BUSCAGLIA, M.; JOLIEVET-JAUDET, G. and LELOUP, J. (1990). Interrenal function during the metamorphosis in anuran amphibians. In: *Progress in Zoology* (W. Hanke, Ed.), *Biology and Physiology of Amphibians*, Vol. 38, pp. 139-154. G. Fischer Verlag, Stuttgart-New York.
- LICHT, L.E. (1967). Growth inhibition in crowd tadpoles: Intraspecific and interspecific effects. *Ecology*, 48: 736-745.
- LOH, Y.P. and GAINER, H. (1977). Biosynthesis, processing, and control of release of melanotropic peptides in the neurointermediate lobe of *Xenopus laevis*. *J. Gen. Physiol.*, 70: 37-58.

- LOH, Y.P. and GAINER, H. (1979). The role of the carbohydrate in the stabilization, processing and packaging of the glycosylated adrenocorticotropin-endorphin common precursor in toad pituitaries. *Endocrinology*, 105: 474-487.
- LOH, Y.P. (1979). Immunological evidence for two common precursors to corticotropins, endorphins and melanotropin in the neurointermediate lobe of the toad pituitary. *Proc. Natl. Sci. USA*, 76: 796-800.
- LOH, Y.P. (1981). Processing, turnover and release of corticotropins, endorphins and melanotropin in the toad pituitary intermediate lobe. In: *Peptides of pars intermedia*. (D. Everd, G. Lawrenson, eds.), pp. 55-70. Pitman Medical Ltd., London.
- MACLEAN, N. and TURNER, S. (1976). Adult hemoglobin in developmentally retarded tadpoles of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morph.* 35: 261-266.
- MALAGON, M.M. (1986). Estudio inmunocitoquímico de las células tireotropas y de prolactina en la adenohipófisis de *Rana ridibunda*: Efecto de la TRH. Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias, Univ. Córdoba.
- MALAGON, M.M.; GARCIA-NAVARRO, S.; GARCIA-HERDUGO, G. and GRACIA-NAVARRO, F. (1988). Immunocytochemical and morphometrical study of thyrotropic cells of *Rana ridibunda*. *Histochemistry*. 89: 461-466.
- MALAGON, M.M.; GARCIA-NAVARRO, S.; RUIZ-NAVARRO, A. and GRACIA-NAVARRO, F. (1989). Morphometric evaluation of subcellular changes induced by *in vivo* TRH treatment in the pituitary gland of *Rana perezi*: Effects on prolactin and thyrotropics cells. *Cell Tissue Res.* 256: 391-398.
- MARGOLIS-KAZAN, H. and SCHREIBMAN, M.P. (1981). Cross-reactivity between human and fish pituitary hormones as demonstrated by immunocytochemistry. *Cell Tissue Res.*, 221: 257-267.
- MARTIN, M.C.; NUÑEZ, A.M. y TOMATIS, M.E. (1985). Metamorfosis en anfibios. I. Desarrollo metamórfico en larvas de *Bufo arenarum* Hensel (AMPHIBIA: ANURA). *Hist. Nat.*, 5: 289-302.
- MATTHEIJ, J.A.M.; STROBAND, H.W.J. and KINGMA, F.J. (1971). The cell types in the adenohypophysis of the cichlid fish *Cichlasoma biocellatum* regan, with special attention to its osmoregulatory role. *Z. Zellforsch.*, 118: 113-126.

- MCKEOWN, B.A. and VAN OVERBEEDE, A.P. (1971). Immunohistochemical identification of pituitary hormone producing cells in the sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*, Walbaum). Z. Zellforsch. 112: 350-362.
- MCNAB, B.K. (1970). Body weight and energetics of temperature regulation. J. Exp. Biol. 53: 329-348.
- MIMNAGH, K.M.; BOLAFFI, J.L.; MONTGOMERY, N.M. and KALTENBACH, J.C. (1987). Thyrotropin-releasing hormone (TRH): Immunohistochemical distribution in tadpole and frog brain. Gen. Comp. Endocrinol., 66: 394-404.
- MIRA-MOSER, F. (1969). Histophysiologic experimentale de la fonction thyreotrope chez le crapaud *Bufo bufo* L. Arch. Anat. Strasbourg., 52: 87-182.
- MIRA-MOSER, F. (1972). L'ultrastructure de l'adenohypophyse du crapaud *Bufo bufo* L. III. Differentiation des cellules de la pars distalis au cours du developpement larvaire. Z. Zellforsch, 125: 88-107.
- MIRANDA, L.; PISANO, A. y PAZ, D. (1993a). Influencia del fotoperíodo y temperatura en el crecimiento corporal y metamorfosis de *Rana catesbeiana*. Rev. Mus. Arg. Cs. Nat. "Bernardino Rivadavia".
- MIRANDA, L. y PISANO, A. (1993b) Efecto de la densidad poblacional en larvas de *Bufo arenarum* producido a través de señales visuales. Alytes, 11: 64-76.
- MIYAUCHI, H.; LAROCHELLE, F.T.; SUZUKI, J; FREEMAN, M. and FRIEDEN, E. (1977). Studies on thyroid hormones and their binding in bullfrog tadpole plasma during metamorphosis. Gen Comp. Endocrinol., 33: 254-266.
- MONDOU, P.M. and KALTENBACH, J.C. (1979). Thyroxine concentrations in blood serum and pericardial fluid of metamorphosis tadpoles and adult frogs. Gen. Comp. Endocrinol., 39: 343-349.
- MORICEAU-HAY, D.; DOERR-SCHOTT, J. et DUBOIS, M.P. (1979). Mise en evidence par immunofluorescence des cellules à prolactine et des cellules somatotropes dans l'hypophyse du têtard de *Xenopus* (*Xenopus laevis* D.). Gen. Comp. Endocrinol., 39: 322-326.
- MORICEAU-HAY, D.; DOERR-SCHOTT, J. and DUBOIS, M.P. (1982). Immunohistochemical demonstration of TSH-, LH-, and ACTH-cells in the hypophysis of tadpoles of *Xenopus laevis* D. Cell tissue Res., 225: 57-64.

- NAKAJIMA, K.; UCHIDA, D.; MAKOTO, S.; TAKAHASHI, N.; YANAGISAWA, T.; YAMAMOTO, K. and KIKUYAMA, S. (1993). Thyrotropin-releasing hormone (TRH) is the major prolactin-releasing factor in the bullfrog hypothalamus. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 89:11-16.
- NEUBRAND, W. and HANKE, W. (1974). Further effects of ACTH and adrenocortical hormones on carbohydrate metabolism in *Xenopus* tadpoles. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 22: 389.
- NIEUWKOOP, P.D. and FABER, J. (1975). Normal table of *Xenopus laevis* Daudin. A systematical and cronological survey of the development on the fertilized eggs till the end of metamorphosis. Amsterdam: North Holland publishing Company.
- NICOLL, C.S. (1974). Physiological actions of prolactin. In: *Handbook of Physiology. IV: Endocrinology.* (E. Knobil, W. H. Sawyer eds.), pp. 253-291. American Physiol. Soc., Washington.
- NIINUMA, K.; YAMAMOTO, K. and KIKUYAMA, S. (1991). Changes in plasma and pituitary prolactin levels in toad (*Bufo japonicus*) larvae during metamorphosis., *Zool. Sci.*, 8: 97-101.
- NIKI K.; YOSHIZATO K. and KIKUYAMA, S. (1981). Augmentation of nuclear binding capacity foe triiodothyronine by aldosterone in tadpole tail. *Proc. Jpn. Acad. Ser.*, B 57: 271-275.
- NORRIS, D.O. (1983). Evolution of endocrine regulation of metamorphosis in lower vertebrates. *Amer. Zool.*, 23: 709-718.
- NORRIS, D.O. (1985). Endocrine regulation of amphibian metamorphosis. En: *Vertebrate Endocrinology.* 2^o Ed., Febiger, Philadelphia, pp. 425-443.
- NYHOLM, N.E.I. (1977). Some morphogenetic features of the adenohypophysial primordium of early *Xenopus laevis* tadpoles. *Cell. Tissue Res.*, 180: 223-230.
- PAZ, D.; RUIZ, G.; CASCO, V.H. and PISANO, A. (1993). The presence of atrial natriuretic peptide (ANP) in spermatozoa of *Bufo arenarum* and effects of GnRH. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 91: 31-37.
- PEHLEMANN, F.W. and HEMME, L. (1972). Morphological transformation of TSH-cell granules in normal and thiouracil treated *Xenopus laevis* larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 18: 615.

- PEHLEMANN, F.W. (1974). Funktionsmorphologie der adenohipophyse von anuren. Fortschritte der zoologie 22, Hefte 2/3: 204-227, Stuttgart, Fischer.
- PEZALLA, P.D.; SEIDAH, N.G.; BENJANNET, P.C.; LIS, M. and CHRETIEN, M. (1978). Biosynthesis of beta-endorphin, betalipotropin and the putative ACTH-LPH precursor in the frog pars intermedia. Life Sci., 23: 2281-2291.
- PISANO, A. (1957). Efficienza funzionale e strutturale dell' ipofisi di Anfibia mantenuta in medio oleoso. Arch. Zool. Ital., 42: 221-227.
- PISANO, A. Y PIZARRO, N. (1958). Observaciones sobre el desarrollo de la gónada de *Bufo arenarum*. Rev. Soc. Arg. Biol., 34: 175-184.
- PLATT, J.E. (1976). The effects of ergocornine on tail height spontaneous and T₄ -induced metamorphosis and thyroidal uptake of radioiodide in neotenic *Ambystoma tigrinum*. Gen. Comp. Endocrinol., 28: 71-81.
- PRAHLAD, K.V. and DELANNEY, L.E. (1965). A study of induced metamorphosis in the axolotl. J. Exp. Zool. 160: 137-146.
- PRIETO-DIAZ, H.E. y ECHAVE LLANOS, J.M. (1947). Citología de la porción distal de la hipófisis de *Bufo arenarum*. Arch. Histol. Norm. y Pat., 3: 541.
- PRIETO-DIAZ, H.E.; ITURRIZA, F.C. y GOMEZ DUMM, C.L.A. (1960). Estudio citológico de la hipófisis del *Bufo arenarum* Hensel. Primer Congreso Sudamericano de zoología 239-250.
- REGARD, E.; TAUROG, A. and NAKASHIMA, T. (1978). Plasma thyroxine and triiodothyronine levels in spontaneously metamorphosing *Rana catesbeiana* tadpoles and in adult anuran amphibia. Endocrinol., 102: 674-684.
- REMY, C. et BOUNHIOU, J.J. (1965). Croissance exageree des têtards de crapaud accoucheur entiers ou primes de leur hypophyse et subissant un traitement par la prolactine. C.R. Soc. Biol. París. 159: 1532-1535.
- REMY, C. et DUBOIS, M.P. (1973). Les cellules somatotropes et les cellules à prolactine de l'hypophyse du têtard d'*Alytes obstetricans* (Laur.) Identification par immunofluorescence. C.R. Soc. Biol. París, 167: 1581-1584.
- REMY, C. and DUBOIS, M.P. (1974). Identification par immunofluorescence des cellules corticotropes et melanotropes de l'hypophyse d'*Alytes obstetricans* (Laur) larvaire. C.R. Soc. Biol. París, 168: 1275-1279.

- REYREL, F. (1970). Developpement embryonnaire et larvaire de l'hypophyse de *Pelobates cultripes* (Batracien, anoure). Ann. Embryol. Morphol., 3: 263-272.
- ROSENKILDE, P. (1979). The thyroid hormones in amphibia. In: "Hormones and evolution" (E.J.W. Barrington, ed), pp. 437-491. Academic Press, New York.
- ROSENKILDE, P. and USING, A.P. (1990). Regulation of metamorphosis. In: Progress in Zoology (W. Hanke, Ed.), Biology and Physiology of Amphibians, Vol. 38, pp. 125-138. G. Fischer Verlag, Stuttgart-New York.
- SAXEN, L.; SAXEN, E.; TOIVONEN, S. and SALIMAKI, K. (1957a). Quantitative investigation on the anterior pituitary-thyroid mechanism during frog metamorphosis. Endocrinol., 61: 35-44.
- SAXEN, L.; SASEN, E.; TOIVONEN, S. and SALIMAKI, K. (1957b). The anterior pituitary and the thyroid function during normal and abnormal development of the frog. Ann. Anat. Zool. Soc. Vanamo, 18: 1-44.
- SAXEN, L. (1958). The onset of thyroid activity in relation to the cytodifferentiation of the anterior pituitary. Histochemical investigation using amphibian embryos. Acta Anat. Basel., 32: 87-100.
- SEKI, T. and KIKUYAMA, S. (1979). Effects of ergocornine and reserpine on metamorphosis in *Bufo bufo japonicus* tadpoles. Endocrinol. Japon., 26: 675-678.
- SEKI, T. and KIKUYAMA, S. (1982). In vitro studies on the regulation of prolactin secretion in the bullfrog pituitary gland. Gen. Comp. Endocrinol., 46: 473-479.
- SHIOMI, K.; HACHIYA, T.; YOSHIMURA, M.; MIYAZAKI, M. and OCHI, Y. (1972). Effects of synthetic TRH (thyrotropin releasing hormone) on tadpole metamorphosis (Japanese). Folia Endocrinol. Jap., 48: 670-673.
- SHIRAI, M.; ARISHIMA, K.; YAMAMOTO, M. and EGUCHI, Y. (1992). Nonresponsiveness of the thyroid gland to goitrogen in the early neonatal period in the rat: Light- and electron-microscopic observations. Acta Anat. 144: 17-22.
- SMITH, P.E. (1916). Experimental ablation of the hypophysis in the frog embryo. Science, 44: 280-282.
- SMITH-GILL, S.J. and BERVEN, K.A. (1979). Predicting amphibian metamorphosis. American Naturalist., 113: 563-585.

- SNYDER, B.W. and FRYE, B.E. (1972). Physiological responses of larva and postmetamorphic *Rana pipiens* to growth hormone and prolactin. J. Exp. Zool., 179: 299-314.
- SNYDER, B.W. and FRYE, B.E. (1974). Effects of prolactin and growth hormone on protein synthesis in larval and adult frogs (*Rana pipiens*). J. Exp. Zool., 190: 167-173.
- STEINWASCHER, K. and TRAVIS, J. (1983). Influence of food quality and quantity on early larval growth of two anurans. Copeia, 143-148.
- SUZUKI, M.R. and KIKUYAMA, S. (1981). Possible involvement of corticoids in anuran metamorphosis. Zool. Mag., 90: 588.
- SUZUKI, M.R. and SUZUKI, M. (1981). Changes in thyroidal and plasma iodine compounds during and after metamorphosis of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. Gen. Comp. Endocrinol., 45: 74-81.
- SUZUKI, M.R. and KIKUYAMA, S. (1983). Corticoids augment nuclear binding capacity for triiodothyronine in bullfrog tadpole tail fins. Gen. Comp. Endocrinol., 52: 272-278.
- TANIGUCHI, Y.; TANAKA, S. and KUROSUMI, K. (1990). Distribution of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone in the brain and hypophysis of larval bullfrogs with special reference to nerve fibers in the pars distalis. Zool. Sci., 7: 427-433.
- TAYLOR, A.C. and KOLLROS, J.J. (1946). Stages in the normal development on *Rana pipiens* larvae. Anat. Rec., 94: 7-23.
- VAN OORDT, P.G.W.J. (1963). Cell types in the pars distalis of the amphibian pituitary. En: Cytologie de l'adénohypophyse. (J. Benoit; C. Da Lage, eds.). Colloq. Int. Centre Nat. Rech. Sci., 128: 301-313.
- VAN OORDT, P.G.W.J. (1966). Changes in the pituitary of the common toad, *Bufo bufo*, during metamorphosis, and the identification of the thyrotropic cells. Z. Zellforsch., 75: 47-56.
- VAN OORDT, P.G.W.J. (1968). The analysis and identification of the hormone-producing cells of the adenohypophysis. In: Perspectives in endocrinology. (E.J.W. Barrington,; C.B. Jorgensen, eds), pp. 253-291. Acad. Press, New York.
- VAN OORDT, P.G.W.J. (1974). Cytology of the adenohypophysis. In: Physiology of the amphibian. Vol. 2 (B. Lofts, ed.), pp. 53-106. Acad. Press, New York.

- VAUDRY, H.; DUPONT, W. et LEBOULENGER, F. (1972). Mise en evidence des cellules corticotropes de l'hypophyse de la grenouille verte, *Rana esculenta* L, par la technique d'immunofluorescence. C.R. Soc. Biol. Paris, 166: 1362-1365.
- VAUDRY, H.; LEBOULENGER, F. TROCHARD, M.C. and VAILLANT, R. (1977). Changes in corticotropin producing cells in the pituitary of *Rana esculenta*. Following interrelectomy and metopirone treatment. An immunohistochemical study. Gen. Comp. Endocrinol., 32: 78-88.
- WEIBEL, E.R. (1979). Stereological methods. Vol. 1: Practical methods for biological morphometry. Acad. Press, New York.
- WEIL, M.R. (1986). Changes in plasma thyroxine levels during and after spontaneous metamorphosis in a natural population of green frog, *Rana clamitans*. Gen. Comp. Endocrinol., 62: 8-12.
- WHITE, B.A. and NICOLL, C.S. (1979). Prolactin receptors in *Rana catesbiana* during development and metamorphosis. Science, 204: 851-853.
- WHITE, B.A. and NICOLL, C.S. (1981). Hormonal control of amphibian metamorphosis. In: A problem in developmental biology. 2^o Ed., (L.I. Gilbert, E. Frieden, eds.), pp. 363-396. Plenum Press, New York.
- WRIGHT, M.L.; JOREY, J.; MYERS, L.; FIELDSTAD, M.; PAQUETTE, A. and CLARK, M. (1988). Influence of photoperiod, daylength, and feeding schedule on tadpole growth and development. Develop. Growth. and Differ., 30: 315-323.
- YAMAMOTO, K. and KIKUYAMA, S. (1981). Purification and properties of bullfrog prolactin. endocrinol. Japon., 28: 59-64.
- YAMAMOTO, K. and KIKUYAMA, S. (1982a). Effect of prolactin antiserum on growth and resorption of tadpole tail. Endocrinol. Japon., 29: 81-85.
- YAMAMOTO, K. and KIKUYAMA, S. (1982b). Radioimmunoassay of prolactin in plasma of bullfrog tadpoles. Endocrinol., 29: 159-167.
- YAMAMOTO, K.; KOBAYASHI, T. and KIKUYAMA, S. (1986a) Purification and characterization of toad prolactin. Gen. Comp. Endocrinol., 63: 104-109.
- YAMAMOTO, K.; NIINUMA, K. and Kikuyama, S. (1986b). Synthesis and storage of prolactin in the pituitary gland of bullfrog tadpoles during metamorphosis. Gen. Comp. Endocrinol., 62: 247-253.

- YAMASHITA, K.; IWASAWA, H. and IWA, H. (1990). Effects of thyrotropin, thyroxine, and thiourea on *Hynobius nigrescens* larvae at low temperature. Sci. Rep. Niigata Univ., Ser. D (Biology), 27: 11-19.
- YAMASHITA, K.; IWASAWA, H. and WATANABE, Y. (1991). Immunocytochemical study on the dynamics of TSH cells before, during, and after metamorphosis in the Salamander, *Hynobius nigrescens*. Zool. Sci., 8: 609-612.
- YAMASHITA K. and KIKUYAMA, S. (1994). Immunohistochemical study of ontogeny of pituitary prolactin and growth hormone cells in *Xenopus laevis*. Zool. Sci. 11: 149-152.
- YOSHIZATO, K. and FRIEDEN, E. (1975). Increase in binding capacity for triiodothyronine in tadpole tail nuclei during metamorphosis. Nature, 254: 705.
- YOUNG, B.A. (1966). Intercellular channels in the canine and porcine thyroid gland. J. Anat., 100: 895-899.
- YU, N.; HSU, C.; KU, H. and WANG, H. (1985). The development of ACTH-like substance during tadpole metamorphosis. Gen. Comp. Endocrinol., 57: 72-76.
- ZEHR, D.L. (1978). Use of hydrogen peroxide-egg albumin to eliminate non specific staining in immunoperoxidase techniques. J. Histochem. Cytochem., 26: 415-416.
- ZIPSER, R.D.; LICHT, P. and BERN, H.A. (1969). Comparative effects of mammalian prolactin and growth hormone on growth in the toads *Bufo boreas* and *Bufo marinus*. Gen. Comp. Endocrinol., 13: 382-391.
- ZUBER-VOGELI, M. et BILHOUES-LOUIS, M.A. (1971). L'hypophyse de *Nectophrunoïdes occidentalis* au cours du développement embryonnaire. Gen. Comp. Endocrinol., 16: 200-216.
- ZUBER-VOGELI, M.; DOERR-SCHOTT, J. et DUBOIS, M.M.P. (1975). Localisation par immunofluorescence des sécrétions apparentées aux hormones gonadotrope, corticotrope, melanotrope et somatotrope dans l'hypophyse de *Nectophrunoïdes occidentalis*. C.R. Acad. Sc. Paris, 280: 1595-1597.
- ZUBER-VOGELI, M. (1983). L'hypophyse de *Nectophrunoïdes occidentalis* Angel (amphibien anoure vivipare). Arch. Biol., 94: 109-154.
- ZUBER-VOGELI, M. and DOERR-SCHOTT, J. (1984). Localisation par immunofluorescence de différents principes hormonaux de l'hypophyse de *Nectophrunoïdes occidentalis* Angel, au cours du développement embryonnaire. Gen. Comp. Endocrinol., 53: 264-271.

***PUBLICACIONES
RELACIONADAS
CON LA TESIS***

IX. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS.

*** Publicaciones directamente relacionadas.**

MIRANDA, L.A.; PISANO, A. and PAZ, D.A. (1992). Effect of potassium perchlorate on thyroid activity of *Bufo arenarum* larvae. Com. Biol. (Bs. As.), 10:125-135.

MIRANDA, L.A.; PISANO, A. and PAZ, D.A. (1993). Erythrocytic luminiscence in *Bufo arenarum* larvae treated with an inhibitor of thyroid function. Com Biol. (Bs. As.), 11:29-39.

MIRANDA, L.A.; PAZ, D.A.; DEZI, R. and PISANO, A. (1994). Immunocytochemical and morphometric study on TSH, PRL, GH, and ACTH cells in *Bufo arenarum* larvae with thyroid function inhibited. (aceptada su publicación en General and Comparative Endocrinology)

MIRANDA, L.A.; PAZ, D.A.; DEZI, R. and PISANO, A. (1994). Immunocytochemical and morphometric study on the dynamic of TSH, PRL, GH and ACTH cells during *Bufo arenarum* development. (aceptada su publicación en Cell and Tissue Research)

*** Publicaciones con relación al tema.**

MIRANDA, L.A.; PAZ D.A. y PISANO, A. (1991). Efecto de la actividad tiroidea en la tolerancia al frío de larvas de *Bufo arenarum*. Revista Española de Herpetología, 6: 55-60.

MIRANDA, L.A. y PISANO, A. (1993). Efecto de la densidad poblacional en el crecimiento corporal y metamorfosis de larvas de *Bufo arenarum* producido a través de señales visuales. Alytes, 11 (2): 64-76.

MIRANDA, L.A.; PISANO, A. y PAZ, D.A. (1993). Efecto del fotoperíodo y la temperatura en el crecimiento corporal y metamorfosis de *Rana catesbeiana*. Revista del Museo de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Tomo IV (5) 53-65.

RENGEL, D.; PISANO, A. and MIRANDA, L.A. (1993). Morphology of the developing gonad of *Bufo arenarum* in the presence of a goitrogen. Com. Biol. (Bs. As.), 11: 111-123.