



UNIVERSIDAD  
CATÓLICA  
DE CUENCA

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

**APLICACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE ESTIMULACIÓN  
HORMONAL PARA EXTRACCIÓN ESPERMÁTICA EN *ATELOPUS  
NANAY, ATELOPUS BOMOLOCHOS Y CTENOPHRYNE  
AEQUATORIALIS***

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO**

AUTORES: HELEN NICOLE CORONEL SARMIENTO

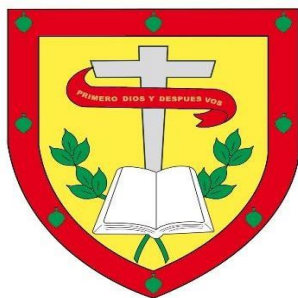
JEFFERSON MAURICIO ZHUMI CAJAMARCA

DIRECTOR: DR. DANIEL ERNESTO ARGUDO GARZÓN

CUENCA – ECUADOR

2023

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS**

**AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

**APLICACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE ESTIMULACIÓN  
HORMONAL PARA EXTRACCIÓN ESPERMÁTICA EN *ATELOPUS  
NANAY, ATELOPUS BOMOLOCHOS Y CTENOPHRYNE  
AEQUATORIALIS***

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO**

**AUTORES:** HELEN NICOLE CORONEL SARMIENTO

JEFFERSON MAURICIO ZHUMI CAJAMARCA

**DIRECTOR:** DR. DANIEL ERNESTO ARGUDO GARZÓN.

**CUENCA – ECUADOR**

**2023**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESAROLLO**

**Declaratoria de Autoría y Responsabilidad**

**Helen Nicole Coronel Sarmiento** portadora de la cédula de ciudadanía N° **0350191862** y **Jefferson Mauricio Zhumi Cajamarca** portador de la cédula de ciudadanía N° **0150765733**. Declaramos ser autores de la obra: “**Aplicación de dos técnicas de estimulación hormonal para extracción espermática en *Atelopus nanay*, *Atelopus bomolochos* y *Ctenophryne aequatorialis***”, sobre la cual nos responsabilizamos sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaramos que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaramos finalmente que nuestra obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también nos responsabilizamos y eximimos a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **20 de septiembre de 2023**



**Helen Nicole Coronel Sarmiento**

**C.I. 0350191862**



**Jefferson Mauricio Zhumi Cajamarca**

**C.I 0150765733**

## CERTIFICACIÓN

Yo Daniel Ernesto Argudo Garzón, con cédula de identidad N° 0104461165 en calidad de Director del Trabajo de Titulación con el tema: “APLICACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE ESTIMULACIÓN HORMONAL PARA EXTRACCIÓN ESPERMÁTICA EN *ATELOPUS NANAY*, *ATELOPUS BOMOLOCHOS* Y *CTENOPHRYNE AEQUATORIALIS*”, certifico que el presente trabajo fue desarrollado por HELEN NICOLE CORONEL SARMIENTO y Jefferson Mauricio Zhumi Cajamarca, bajo mi supervisión.



Dr. Daniel Ernesto Argudo Garzón. Mgs.

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**



Firmado electrónicamente por:  
**DANIEL ERNESTO  
ARGUDO GARZON**

## **Agradecimiento**

Yo Helen Nicole Coronel Sarmiento, deseo expresar mi profundo agradecimiento por este logro en mi vida. En primer lugar, a Dios, quien me ha bendecido con sabiduría e inteligencia para llegar hasta este punto. También quiero agradecer a mis padres, cuyo amor, confianza y apoyo incondicional me han permitido llegar hasta aquí hoy. A mis abuelos y familia, les agradezco por cuidarme y guiarme por el camino correcto, su apoyo ha sido fundamental para mi bienestar.

Quiero extender mi gratitud a mi segunda familia, la familia AUSTROVET, por brindarme risas, lecciones y buenos momentos inolvidables. Agradezco especialmente al Dr. Jaime Lazo, director de AUSTROVET, por compartir su vasto conocimiento, sabios consejos y por los momentos compartidos llenos de alegría. Cada experiencia, tanto positiva como desafiante, nos ha ayudado a crecer y aprender juntos.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a todos mis maestros, quienes han sido guías excepcionales en mi formación profesional. A través de su dedicación y enseñanzas, me han inspirado a seguir buscando el conocimiento y a mejorar como persona. Agradezco también a mis amigos, quienes han sido un gran apoyo y compañía en esta etapa de mi vida, gracias por las risas, los buenos y malos ratos, de todo lo vivido me quedan unos bellos recuerdos y espero poder seguir teniendo muchos más de esos.

Sé que todavía hay mucho por aprender, y espero seguir encontrando en mi camino a personas especiales como ustedes. ¡Gracias a todos por ser parte de este importante logro!

## **Agradecimiento**

Yo Jefferson Mauricio Zhumi Cajamarca, me complace expresar mi profundo agradecimiento a las personas más importantes en mi vida. En primer lugar, quiero agradecer de todo corazón a mi madrecita. A pesar de las dificultades y los momentos difíciles, siempre ha estado a mi lado brindándome su apoyo incondicional para alcanzar este importante logro en mi vida. Sin su constante aliento y amor, no habría sido posible completar mis estudios, y le agradezco infinitamente por ser mi fuerza y guía.

También quiero agradecer a mi hermana mayor, quien ha sido mi compañera en las buenas y en las malas. Gracias a ella, me he convertido en el hombre que soy. Juntos seguiremos luchando para alcanzar todos nuestros sueños y metas.

En segundo lugar, mi gratitud se extiende a mis hermanos, primos, tíos y maestros, quienes siempre estuvieron presentes brindándome sus consejos y apoyo incondicional. Su cariño y aliento fueron fundamentales en este proceso, y estoy agradecido por brindarme su sabiduría.

En tercer lugar, quiero agradecer a mis amigos, quienes se convirtieron en una parte esencial de mi vida durante todo este tiempo. Gracias por compartir alegrías, brindarme su apoyo y estar presentes en las buenas y en las malas. Su amistad ha sido un regalo invaluable que llevaré siempre en mi corazón mientras continúo en esta emocionante travesía. ¡Gracias de todo corazón!

Finalmente, mi agradecimiento a Dios, quien me ha brindado la sabiduría y fortaleza para alcanzar uno de mis muchos sueños. Dedico este logro a mi querida abuelita, que desde el cielo me brinda su cariño y protección. Te amo mucho, mi viejita.

## INDICE

### Contenido

<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>Introducción</b> .....	10
<b>Fundamento Teórico</b> .....	11
Generalidades de las especies de anfibios analizados.....	11
Diversidad de especies de anfibios en Ecuador y su hábitat en los páramos y subpáramos de la cordillera de los Andes.....	11
Registros de las especies estudiadas y acciones de conservación ex situ para especies amenazadas en Cuenca- Ecuador.....	11
Efectos de la aplicación de GnRH y hCG en la liberación y concentración espermática en diferentes especies de anfibios.....	12
Efectos de la aplicación de hormonas en la liberación y concentración espermática en especies de anuros.....	12
El papel del neuropéptido de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en la reproducción de los anfibios y su importancia en la conservación de estas especies.....	13
Regulación neuro-humoral de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en la reproducción de los anfibios y su relación con la producción de la hormona luteinizante (LH).....	13
<b>Materiales y Métodos</b> .....	13
<b>Desarrollo Experimental</b> .....	14
Especies y cuarentena de los individuos.....	14
Nutrición y alimentación.....	14
La contención física de los anuros.....	15
Aplicación de tratamientos y evaluación de muestras.....	15
Cálculo de dosis.....	15
Colecta de orina espermática y evaluación.....	15
<b>Resultado y Discusión</b> .....	16
<b>Conclusión</b> .....	21
<b>Agradecimiento</b> .....	22
<b>Bibliografía</b> .....	23

## RESUMEN

Ecuador es reconocido por su gran diversidad de especies de anfibios, que actualmente están siendo amenazados a nivel mundial. En este contexto, el presente estudio evaluó la viabilidad de dos técnicas hormonales (GnRH y hCG) para mejorar el rendimiento espermático en tres especies: *Atelopus nanay*, *Atelopus bomolochos* y *Ctenophryne aequatorialis*, en la provincia de Azuay.

La aplicación de hormonas ha demostrado ser efectiva en la estimulación para la liberación de espermatozoides en anfibios. Estudios anteriores han obtenido resultados positivos al utilizar GnRH y hCG en diferentes especies. La conservación bajo cuidado humano de los anfibios se ha convertido en algo crucial debido a la disminución de las poblaciones in situ, actualmente se cuenta con un centro de conservación de anfibios de la fundación Amaru en la ciudad de Cuenca- Ecuador.

Se realizó la colecta espermática en tres especies de anfibios con dosis hormonales de 4  $\mu\text{g/g}$  y 5  $\mu\text{g/g}$  respectivamente. Los resultados demuestran diferencias significativas en los parámetros espermáticos entre las especies y los tratamientos hormonales aplicados. Se demostró que la aplicación de GnRH y hCG genera un elevado índice de motilidad entre las 3.5 y 5.5 horas post aplicación y una concentración espermática elevada entre las 2.5 y 3.5 horas post aplicación de los tratamientos, en *Atelopus nanay* y *Atelopus bomolochos*. En la especie *Ctenophryne aequatorialis* no se obtuvieron resultados relevantes.

**Palabras clave:** Ecuador, anfibios, conservación, diversidad genética, hormonas, GNRH, hCG.

## ABSTRACT

Ecuador is recognized for its great diversity of amphibian species currently threatened worldwide. In this context, this study evaluated the feasibility of two hormonal techniques (GnRH and hCG) to improve sperm performance in three species: *Atelopus nanay*, *Atelopus bomolochos*, and *Ctenophryne aequatorialis*, in the Azuay province.

The application of hormones is effective in stimulating sperm release in amphibians. Previous studies have obtained favorable results using GnRH and hCG in different species. The conservation of amphibians under human care has become crucial due to the decline of in situ populations. Currently, there is an amphibian conservation center of the Amaru Foundation in Cuenca, Ecuador.

Sperm collection was conducted in three species of amphibians with hormone doses of 4 µg/g and five µg/g, respectively. The results show significant differences in sperm parameters between species and hormone treatments applied. It was demonstrated that the application of GnRH and hCG generated a high motility index between 3.5- and 5.5-hours post-application and a high sperm concentration between 2.5- and 3.5-hours post-application of the treatments in *Atelopus nanay* and *Atelopus bomolochos*. No relevant results were obtained for the species *Ctenophryne aequatorialis*.

**Keywords:** Ecuador, amphibians, conservation, genetic diversity, hormones, GnRH, hCG.

## INTRODUCCIÓN

Los anfibios poseen la capacidad de producir una gran cantidad de germoplasma en un solo evento reproductivo los cuales al no ser utilizados, colectados o preservados serían un recurso valioso desperdiciado (Clulow *et al.*, 2019). Ecuador representa uno de los países con mayor diversidad de especies de anfibios los cuales son considerados como los más amenazados en América del Sur, de acuerdo con los datos presentes en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Ortega *et al.*, 2021).

Las dificultades reproductivas en anfibios en cautiverio son una situación recurrente, en gran medida debido a la compleja interacción de señales ambientales necesarias para el éxito en su reproducción. Estas señales abarcan desde una variedad de estímulos abióticos hasta factores bióticos. Sumado a ello, los requisitos ambientales son altamente variable entre especies. A pesar de los esfuerzos realizados en la implementación de programas de cría destinados a preservar la diversidad de especies de anfibios en distintas regiones del mundo, su efectividad sigue siendo insuficiente para hacer frente a la marcada disminución de las poblaciones de anfibios a nivel global (Silla *et al.*, 2021). Así misma presencia de actividad como la agricultura, la minería y la ganadería e incluso la introducción de especies invasoras como es el caso de la trucha arcoíris la cual su alimento principal son los renacuajos de las ranas arlequín y junto con la contaminación y el cambio climático están contribuyendo a que estas especies vayan desapareciendo (La Marca *et al.*, 2005).

La maduración, liberación y comportamientos reproductivos de los gametos son desencadenados principalmente por la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) de la región preóptica anterior del hipotálamo, la liberación de esta hormona estimula a la síntesis y liberación de la hormona luteinizante (LH) folículo estimulante (FSH), estas inducen la ovogénesis y ovulación en las hembras y la espermatogénesis y espermiación en los machos (Silla & Byrne, 2019). Los anfibios poseen una amplia sensibilidad a la hCG mientras que la GnRH-a es más eficaz en provocar una respuesta de espermiación (Clulow *et al.*, 2014).

En la actualidad las tecnologías reproductivas han permitido el máximo control en los diseños de reproducción siendo utilizadas de manera efectiva para aumentar el potencial de adaptación y la diversidad genética de los anfibios que han sido criados en cautiverio (Silla *et al.*, 2018). Las inyecciones se pueden administrar de manera segura sin importar el tamaño de la especie para esto se requiere un entrenamiento mínimo y el uso de materiales esterilizados (Browne *et al.*, 2019). Las técnicas de estimulación hormonal funcionan como potenciadores del rendimiento espermático en anuros en comparación con la producción natural.

El presente estudio evaluó la viabilidad de la aplicación de dos técnicas hormonales para el rendimiento espermático en 3 especies de la provincia del Azuay. Los objetivos específicos fueron establecer la efectividad de dos tratamientos hormonales (GnRH y hCG) para la liberación de espermatozoides en las especies *Atelopus nanay*, *Atelopus bomolochos* y *Ctenophryne aequatorialis*, además de comparar el efecto de los tratamientos hormonales sobre los parámetros espermáticos a las 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5 y 24 horas post inyección, en las tres especies y conjuntamente identificar el tiempo óptimo de recuperación espermática luego de la aplicación de los tratamientos.

## 1. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 1.1. Generalidades de las especies de anfibios analizados.

La especie *Atelopus nanay*, pertenece a la familia Bufonidea y del orden Anura posee un dorso negro, espículas blancas y un vientre de color negro o crema con marcas verdes o marrones, constan de una cabeza ancha y larga, el hocico truncado, las fosas nasales son ligeramente protuberantes ubicadas de forma lateral, la membrana timpánica y el anillo timpánico están ausentes, su lengua es dos veces más larga que ancha, el color ventral en los machos va de crema uniforme a crema con marcas de color marrón oscuro, tubérculos plantares y palmares, posee una fórmula falangelar de 1-2-3-3 (Coloma, 2002).

La especie *Atelopus bomolochos* perteneciente a la familia Bufonidae y del orden Anura es posible encontrarlo en regiones como el Bosque Montano Occidental, el Bosque Montano Oriental, Paramo, Matorral Interandino, los machos tienen una longitud rostro-cloacal promedio de 38.4 a 40.8mm. esta rana puede ser de color amarillo, amarillo con café o verde amarillento, con puntos negros en el dorso y el vientre, posee verrugas en los flancos y patas cortas.

En cuanto a *Ctenophryne aequatorialis*, especie endémica del Ecuador, pertenece al orden Anura y la familia Microhylidae, lo podemos encontrar en la provincia del Azuay se lo puede encontrar en los Matorrales Interandinos y en altitudes templadas occidentales, su hábitat natural son los pastizales, prados y en campos agrícolas, posee un patrón dorsal junto con marcas oscuras en un fondo claro y además posee membranas basales en los dedos de los pies, sus renacuajos llegan a la metamorfosis a los 3 meses de edad, actualmente se encuentra en el estado de conservación de la lista roja de anfibios del Ecuador. (Ron *et al.*, 2018).

### 1.2. Diversidad de especies de anfibios en Ecuador y su hábitat en los páramos y subpáramos de la cordillera de los Andes.

En el Ecuador existe un registro de 676 especies de anfibios de acuerdo con (Bioweb, 2022) convirtiéndose así, en el tercer país del mundo con mayor variedad de anfibios, además es la nación que posee una mayor concentración de especies por unidad superficial. Es decir, Ecuador alberga en su territorio 3 veces más especies por kilómetro cuadrado que Colombia y 21 veces más que Brasil (Ministerio de Ambiente y Agua, 2020). El Ecuador tiene hábitats que aún no se encuentran adecuados para estas especies de ranas (*Atelopus nanay*, *Atelopus bomolochos* y *Ctenophryne aequatorialis*), pero cuentan con un ecosistema de páramos herbáceos y subpáramos, ubicado en Cordillera de Los Andes ecuatorianos, se encuentran en riachuelos, vertientes, pozos, bajo piedras, pastizales, prados, estanques y campos agrícolas entre otros.

### 1.3. Registros de las especies estudiadas y acciones de conservación ex situ para especies amenazadas en Cuenca- Ecuador.

En la actualidad la especie *Atelopus nanay* ha sido registrada en el Parque Nacional El Cajas en la provincia de Azuay. Por otra parte, la especie *Atelopus bomolochos* no se han registrado en la Ciudad de Cuenca durante los últimos 30 años, una de las poblaciones registradas es el cantón Sígfig. El anuro *Ctenophryne aequatorialis*, existe una población urbana en el sector de Monay Baguanchi en la ciudad de Cuenca, también se encuentran en la parroquia Tarqui de la provincia del Azuay y el cantón Saraguro de la provincia de Loja a 2450 y 2650 msnm. De acuerdo con Ron *et al.* (2021), Ron *et al.*, (2021), Coloma *et al.*, (2021) y Siavichay *et al.* (2016). Hoy en día existen varios esfuerzos de conservación

para anfibios tanto *in situ* como *ex situ*. El Centro de Conservación de Anfibios (CCA) es un proyecto para la protección de las especies de anfibios en el sur del país establecida por el Bioparque Amaru hace aproximadamente 15 años.

#### **1.4. Aplicación de técnicas hormonales para su uso en biotecnologías de la reproducción en anfibios.**

Comprender mejor la fisiología reproductiva será de gran ayuda en los programas de reproducción, generando poblaciones de individuos genéticamente diversos, en este caso, los anfibios machos son capaces de excretar orina espermática después de aplicados los estímulos hormonales, sin embargo, se tiene que considerar que los resultados van a variar entre especies. Las hormonas hCG y GnRH han sido utilizadas ampliamente en numerosas especies, siendo esta última utilizada de forma individual o en combinación como antagonistas de la dopamina por ejemplo la metoclopramida (Della *et al.*, 2017)

#### **1.5. Efectos de la aplicación de GnRH y hCG en la liberación y concentración espermática en diferentes especies de anfibios.**

En un estudio realizado por Silla *et al.* (2019) con la aplicación de GnRH-a en 75 ranas macho de la especie *Litoria booroolongensis* se demostró que la aplicación de esta hormona en las ranas a dosis de 0.5 µg/g de peso dando como resultado una liberación espermática superior a las ranas que no fueron sometidas a ningún tratamiento de GnRH-a, mientras que en un estudio realizado en ranas *Atelopus zeteki*, por Della *et al.* (2017) demostró que a las 3.5 h post aplicación de las hormonas hCG y GnRH manifestaron un gran pico de concentración espermática, también se encontró que la aplicación de 10 µg/g de peso de hCG genero una mayor motilidad espermática.

#### **1.6. Efectos de la aplicación de hormonas en la liberación y concentración espermática en especies de anuros.**

La investigación realizada por Silla y Roberts (2012) demostró que la filogenia de las especies influye en la eficacia de las hormonas que fueron aplicadas en las ocho especies de anuros que se utilizaron en su investigación, sus resultados no demostraron una diferencia significativa en la producción de espermatozoides tras la aplicación de las hormonas hCG y LHRHa pero si mostraron una mejor respuesta de acuerdo a la familia a la que pertenecían, la familia Mybatrachidae mostraron una mejor respuesta luego de la aplicación de LHRHa y la familia Lymnodynastidae tuvo una mejor producción de espermatozoides con la hormona hCG.

#### **1.7. Aplicación de la hormona hCG vía intraperitoneal y su efecto en la producción espermática en anuros.**

Langhorne, Calatayud y Vance (2021) en su estudio en sapos boreal de las montañas rocosas del sur indican que la aplicación de la hormona hCG vía intraperitoneal a dosis de 10 µg/g de peso y 15 µg/g mostraron una mayor producción de espermatozoides en comparación con una dosis baja de 3 µg/g. La técnica intraperitoneal es una inyección que introduce hormonas en la cavidad rodeada por la membrana. Aunque esta técnica se usa más para inyectar medicamentos en ratones de laboratorio, también se ha llegado a utilizar en ranas para obtener una concentración espermática más alta, ayudando así también a su conservación. Donde se han utilizado dosis de GnRH-A + metoclopramida de 0, 0.4, 1, 2, 4, 8 o 16, µg/g de peso GnRH-A + 10 µg/g de peso de clorhidrato de metoclopramida de peso corporal (Della Togna *et al.*, 2017; Silla *et al.*, 2019).

### **1.8.El papel del neuropéptido de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en la reproducción de los anfibios y su importancia en la conservación de estas especies.**

Se han realizado estudios en los que se ha demostrado que el neuropéptido de hormona liberadora de gonadotropina o (GnRH) tiene efectos importantes y estimulantes para inducir el desove en los anfibios, una reproducción exitosa de las ranas es compleja y necesita de una adecuada coordinación entre las señales fisiológicas, conductuales y ambientales además de involucrar una interacción entre el sistema nervioso y endocrino para permitir así la liberación de gametos en el momento adecuado para la fertilización. Sin embargo, el declive global junto con la desaparición de varios anfibios a nivel mundial sigue siendo una crisis inminente (Vu & Trudeau, 2016).

### **1.9.Regulación neuro-humoral de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en la reproducción de los anfibios y su relación con la producción de la hormona luteinizante (LH).**

La producción de GnRH en estas especies es regulada por un mecanismo neuro-humoral generando varios cambios químicos que empiezan a manifestarse desde el cortejo, la GnRH permite a la hipófisis liberar gonadotropinas LH/FSH, su gen regulador se encuentra localizado en el cromosoma 8 el cual ha sido conservado desde el ser humano hasta los peces (Prieto & Velázquez, 2002). La elaboración y liberación de esta hormona está relacionada con la región preóptica anterior del hipotálamo (Silla & Byrne, 2019). Esta estimula la liberación de la hormona luteinizante (LH) la cual es necesaria para controlar la ovulación y la espermiación en los vertebrados. (Vú, Weiler, & Trudeau, 2017). La GnRH activa a los receptores de GnRH en las células productoras de LH que se encuentran en la hipófisis estimulando la producción y liberación endógena de LH, la cual actúa sobre las gónadas masculinas y femeninas estimulando la producción de esteroides sexuales y el desove. (Trudeau, y otros, 2010).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Área de estudio**

La fase experimental se desarrolló en el Centro de Conservación de Anfibios de la Fundación Amaru, que se encuentra ubicado en la Autopista Cuenca - Azogues Km 10 ½.

### **2.2.Tratamiento y variables de estudio**

El tipo de estudio fue experimental. Los tratamientos aplicados fueron con hCG, GnRH, Amphibians ringer solution (ARS) y sin inyección (Control). Las variables dependientes evaluadas fueron: el *volumen* que fue medido con la ayuda de una micropipeta y se expresó en microlitros.

*Concentración espermática* se determinó en la cámara de Neubauer y un microscopio con los cuales se realizaron un conteo espermático y se expresaron en millones/mL.

*La Motilidad individual progresiva* fue analizada con la ayuda de un microscopio óptico. Se realizó una evaluación subjetiva de los espermatozoides y se registró en porcentaje. Para determinar el *pH* se aplicó 1µl de muestra espermática sobre una tira de pH (Merck Millipore, Alemania) y luego subjetivamente se evaluó y registró el nivel por el cambio de color.

### 2.3. Diseño experimental

En total se trabajaron con 12 anfibios, 4 machos de cada especie, el experimento fue realizado mediante un Diseño de Bloques Variados las diferencias entre:

- 3 especies *Atelopus nanay* (A), *Atelopus bomolochos* (B) y *Ctenophryne aequatorialis* (C).
- 2 hormonas y 2 controles (hCG, GnRH, ARS y Control).
- 7 tiempos (0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, y 24 horas post aplicación hormonal).
- 4 repeticiones (semana).

## 3. DESARROLLO DEL EXPERIMENTO

### 3.1. Especies y cuarentena de los individuos

Durante el manejo *ex situ* en el Centro de Conservación de Anfibios AMARU, los anfibios pasaron por un periodo de cuarentena, durante el cual los médicos veterinarios y biólogos llevaron a cabo exámenes de rutina, para evaluar el estado de salud y presencia de parásitos. Se observó cuidadosamente la etología propia de cada especie y se realizó un examen coproparasitario. Los datos recopilados para *Atelopus nanay* mostraron que la edad promedio de los individuos oscilaba entre 6 y 8 años, con un peso promedio de 3,82 a 6,26 gr. Para la especie *Atelopus bomolochos*, la edad promedio fue de 4 a 6 años, con un peso de 3 a 3,71 gr. Por último, la especie *Ctenophryne aequatorialis* presentó un rango de edad entre 2 y 5 años y un peso de 1,14 a 2,02 gr. Estos datos fueron recolectados de manera precisa y permitieron una adecuada dosificación de los individuos en estudio.



Fotografía de las tres especies estudiadas: *Atelopus nanay* (A), por Jaime Culebras, *Atelopus bomolochos* (B), por Jaime Culebras y *Ctenophryne aequatorialis* (C), por Juan Carlos Sánchez.

### 3.2. Nutrición y alimentación

En el centro de conservación de anfibios, se implementó una alimentación rigurosa para el desarrollo adecuado de los anfibios. Se mantuvo un equilibrio entre insectos e invertebrados, como grillos, moscas de la fruta y larvas de polilla. Estos fueron alimentados tres veces por semana, siguiendo normas de bioseguridad en los laboratorios.

Antes de aplicar el tratamiento, los anfibios pasaron por un ayuno de 24 horas para evitar la presencia de heces que pudieran contaminar las muestras. Este procedimiento no generó inconvenientes, ya que una vez obtenidas las muestras, se devolvieron a su entorno y se les proporcionó la dieta que fue establecida por el personal a cargo.

### **3.3. La contención física de los anuros**

El personal técnico del CCA realizó la manipulación de los anfibios, para lo cual se utilizó guantes desechables de nitrilo. La sujeción de los animales fue de forma segura, evitando al máximo procesos invasivos que no causen daños físicos en los individuos, luego de esto se desecharon los guantes en contenedores de material contaminado.

### **3.4. Aplicación de tratamientos y evaluación de muestras**

En este experimento se comparó la aplicación de dos hormonas GnRH y hCG y dos controles, uno con ARS y otro sin inyección utilizando en ambos casos la vía intraperitoneal a dosis de 5  $\mu\text{g/g}$  de peso de hCG y 4  $\mu\text{g/g}$  de peso de GnRh-A en 4 machos de cada especie por la disponibilidad de las especies, seguidamente se registraron los siguientes datos: volumen, concentración, motilidad y pH, en 7 tiempos y se compararon los datos con el mejor tiempo para la recuperación espermática en cada una de las especies estudiadas.

### **3.5. Cálculo de dosis**

El primer paso consistió en pesar a cada individuo de cada especie con el uso de guantes de nitrilo, para calcular con precisión la dosis exacta de hormona a aplicar. Luego, se calculó la cantidad de hormona requerida para cada especie, siendo esta de 5  $\mu\text{g/g}$  de peso o 4  $\mu\text{g/g}$  de peso, según la hormona a utilizar por el peso específico de la especie. Estos valores se interpretaron en forma de  $\mu\text{l}$  y se cargaron en una jeringa de insulina. Posteriormente, con la colaboración de dos técnicos, se sujetó a cada espécimen, se secó la zona donde se aplicaría la hormona y se procedió a aplicar la inyección.

#### **3.5.1. Colecta de orina espermática y evaluación**

Después de aplicar la hormona, las ranas fueron colocadas en sus respectivos contenedores y se esperó un período de 30 minutos para iniciar la primera colecta. Una vez transcurrido este tiempo, se estimuló la micción de las ranas utilizando un catéter #26, lo cual se llevó a cabo en un máximo de 10 minutos, aunque en algunas ocasiones las ranas expulsaron la orina espermática al momento de ser manipuladas (Rodríguez, Iglí, & Della Togna, 2021). Luego de que las ranas expulsaron la muestra, procedimos a extraer las muestras con el uso de una pipeta de 10  $\mu\text{l}$  y 100  $\mu\text{l}$  y se transfirió a un tubo eppendorf, registrando cuidadosamente el volumen en cada caso. A continuación, se midió el valor de pH de la muestra utilizando una tira de pH para lo cual se empleó 1  $\mu\text{l}$  de la muestra, seguidamente se colocó 1  $\mu\text{l}$  en la cámara de Neubauer. Conjuntamente con la ayuda de un microscopio y utilizando un lente de 40 aumentos, se observó la movilidad y motilidad de los espermatozoides presentes en la muestra.

Posteriormente se colocó 9  $\mu\text{l}$  de agua para diluir la muestra y procedimos a contar la cantidad de espermatozoides en 5 cuadrantes de la cámara de Neubauer, se contaron de forma paralela y recta a fin de considerar todas las posibles cantidades, luego se procedió a registrar todo lo antes realizado en una hoja de control la misma que fue diferenciada por especie, hormona y día. Todo el procedimiento se volvió a repetir durante cada una de las colectas en los tiempos que fueron establecidos.

Finalmente se realizó la colecta con los tratamientos de control en las mismas especies pero sin la aplicación de las hormonas. En lugar de estas, se utilizó Amphibian's ringer solution (ARS) y sin la aplicación de ninguna sustancia, esto se efectuó en cada una de las ranas, el procedimiento a realizar fue el mismo que cuando se les aplicó las hormonas, una vez finalizada la extracción en todos los tiempos planteados, las ranas fueron evaluadas y devueltas a sus respectivos terrarios.

Se comparó la aplicación de las dos hormonas GnRH y hCG aplicadas vía intraperitoneal a dosis de 5  $\mu\text{g/g}$  de peso de hCG y 4  $\mu\text{g/g}$  de peso de GnRh-A y los tratamiento de Control en 4 machos de cada

especie, se realizaron colectas espermáticas a las 0,5, 1,5, 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, y 24 horas post aplicación del tratamiento.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En nuestro estudio, realizamos la colecta espermática en tres especies de anfibios: *Atelopus nanay*, *Atelopus bomolochos* y *Ctenophryne aequatorialis*. Los resultados obtenidos revelaron diferencias significativas en los parámetros espermáticos entre las especies y los tratamientos hormonales aplicados.

De acuerdo con la Tabla 1 en la especie *Atelopus nanay*, se observó una alta colecta de volumen de orina espermática con las hormonas utilizadas (GNRH, hCG,) y controles ARS y sin inyección a las 24 horas de colecta. La motilidad espermática fue mayor a las 3,5 horas con GNRH y a las 5,5 horas con hCG. El pH se mantuvo constante en todas las horas de colecta. Además, la concentración espermática fue mayor a las 3,5 horas con GNRH y hCG

**Tabla 1.** Valores de volumen, motilidad, pH y concentración espermática de *Atelopus nanay*. Los datos mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar.

<b>Tratamiento</b>							
<b>Volumen(<math>\mu</math>L)</b>	<b>0,5</b>	<b>1,5</b>	<b>2,5</b>	<b>3,5</b>	<b>4,5</b>	<b>5,5</b>	<b>24</b>
GNRH	8,2 $\pm$ 5	27,1 $\pm$ 15,2	23,3 $\pm$ 17,4	25 $\pm$ 28	10 $\pm$ 9	32 $\pm$ 29	37 $\pm$ 46
hCG	10 $\pm$ 3,5	13 $\pm$ 3,3	20 $\pm$ 26	48 $\pm$ 53	24,3 $\pm$ 29,4	41 $\pm$ 73	62 $\pm$ 66
ARS	16,5 $\pm$ 19	19,1 $\pm$ 22	36,5 $\pm$ 33	16,1 $\pm$ 17,5	38 $\pm$ 40,5	29 $\pm$ 13,5	82,1 $\pm$ 50,5
CONTROL	31 $\pm$ 22,2	21 $\pm$ 25,3	31,3 $\pm$ 40	29,3 $\pm$ 21	31,4 $\pm$ 32	21,3 $\pm$ 20	36 $\pm$ 42
<b>pH</b>							
GNRH	7 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 3,4	5 $\pm$ 3,3	7,0 $\pm$ 0,4	6,3 $\pm$ 0,2	4,5 $\pm$ 3
hCG	6,2 $\pm$ 0,5	6,3 $\pm$ 0,4	7 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 3,5	7 $\pm$ 0,2	5 $\pm$ 4	6,3 $\pm$ 0,5
ARS	6,5 $\pm$ 0,5	6,5 $\pm$ 0,7	6,5 $\pm$ 0,4	7 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 0,4	7 $\pm$ 0,4	6,2 $\pm$ 0,2
CONTROL	6,1 $\pm$ 0,2	6,2 $\pm$ 0,3	6,5 $\pm$ 0,5	7 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 0,2	6,1 $\pm$ 0,2
<b>Concentración (<math>\times 10^6</math>)</b>							
GNRH	0	0,3 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,9	0
hCG	0	0,8 $\pm$ 1,6	0,5 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 2,2	1,8 $\pm$ 2,1	1,8 $\pm$ 2,2	0
ARS	0	0	0	0	0	0	0
CONTROL	0	0	0	0	0	0	0
<b>Motilidad (%)</b>							
GNRH	0	25 $\pm$ 50	44,1 $\pm$ 51,5	68,2 $\pm$ 46,1	45 $\pm$ 52,2	44,0 $\pm$ 51,5	0
hCG	0	37,5 $\pm$ 45	40 $\pm$ 47	62,5 $\pm$ 42,5	66,2 $\pm$ 46	71 $\pm$ 47,2	0
ARS	0	0	0	0	0	0	0
CONTROL	0	0	0	0	0	0	0

Referente a la Tabla 2 la especie *Atelopus bomolochos*, se obtuvieron resultados diferentes. El porcentaje colecta de volumen fue mayor a las 4,5 horas con GNRH y a las 5,5 horas con hCG. La motilidad espermática alcanzó su máximo a las 2,5 horas con ambas hormonas. El pH no mostró cambios significativos en cada tratamiento, manteniéndose en un pH de 7 en todas las horas de colecta. La concentración espermática fue mayor a las 3,5 horas con GNRH y a las 2,5 horas con hCG.

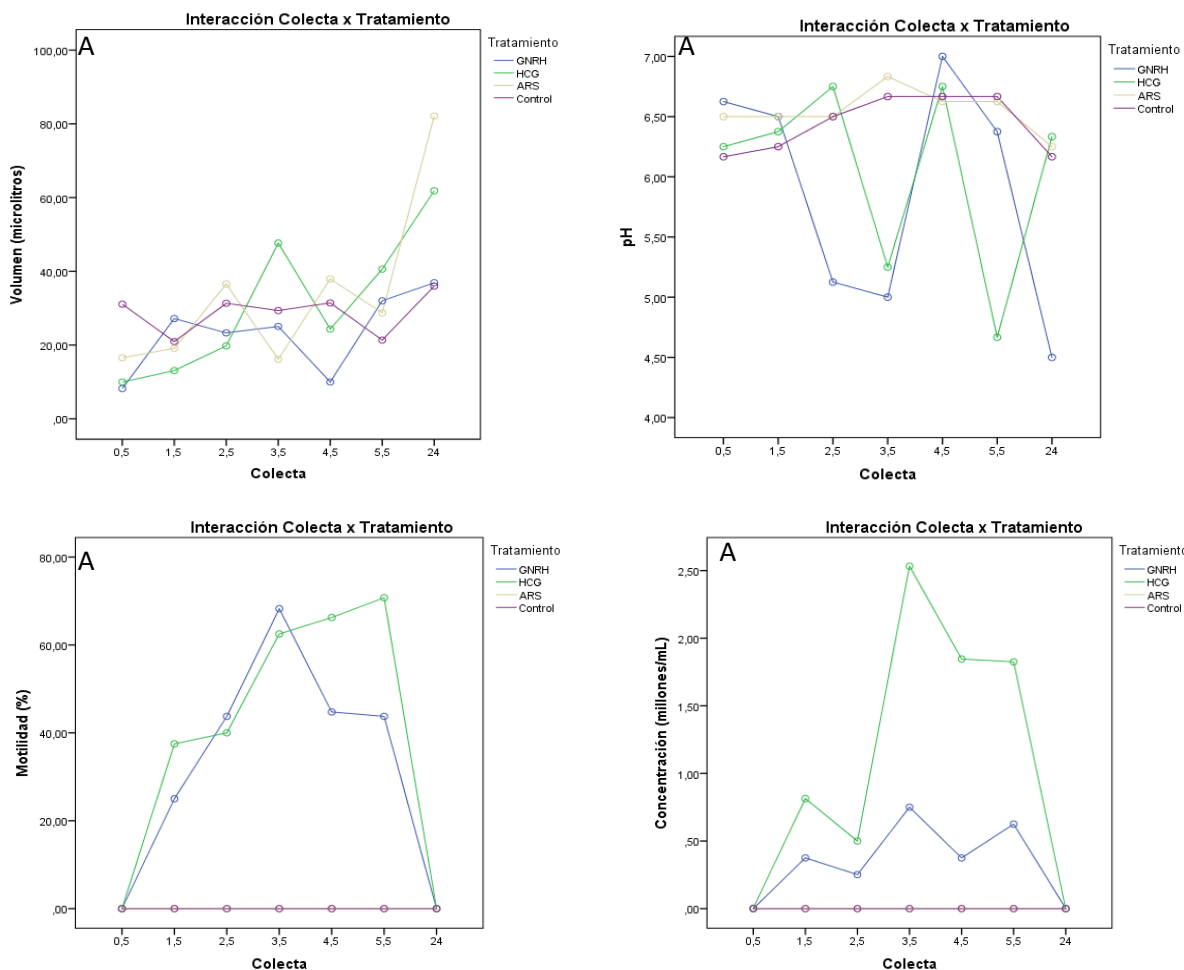
**Tabla 2.** Porcentajes de volumen, motilidad, pH y concentración espermática de *Atelopus bomolochos*. Los datos mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar.

<b>Tratamiento</b>							
<b>Volumen(<math>\mu</math>L)</b>	<b>0,5</b>	<b>1,5</b>	<b>2,5</b>	<b>3,5</b>	<b>4,5</b>	<b>5,5</b>	<b>24</b>
<b>GNRH</b>	12,3 $\pm$ 11	28,2 $\pm$ 41	41 $\pm$ 25,1	40,1 $\pm$ 33,5	54,3 $\pm$ 36,1	51,3 $\pm$ 38	37 $\pm$ 44,3
<b>hCG</b>	7 $\pm$ 6,5	8,4 $\pm$ 4,1	19 $\pm$ 13	34,5 $\pm$ 33,5	27 $\pm$ 20,4	46 $\pm$ 40	34,4 $\pm$ 50
<b>ARS</b>	17 $\pm$ 11,3	18,4 $\pm$ 12	21,2 $\pm$ 12	21 $\pm$ 13	32 $\pm$ 23	44 $\pm$ 20	41 $\pm$ 24,4
<b>CONTROL</b>	8 $\pm$ 11	8,2 $\pm$ 7,5	2 $\pm$ 1,5	23,1 $\pm$ 19	33 $\pm$ 36,2	46 $\pm$ 38,1	16 $\pm$ 25
<b>pH</b>							
<b>GNRH</b>	6,3 $\pm$ 0,4	7 $\pm$ 0,5	7 $\pm$ 0	7 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 0	7 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 0,5
<b>hCG</b>	7 $\pm$ 0	7 $\pm$ 0	7 $\pm$ 0	7 $\pm$ 0	7 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 0,5
<b>ARS</b>	7 $\pm$ 0,5	7 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 0	7 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 0,4
<b>CONTROL</b>	7 $\pm$ 0	6,5 $\pm$ 0,5	6,5 $\pm$ 0,5	7 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 0
<b>Motilidad(<math>\times 10^6</math>)</b>							
<b>GNRH</b>	0	50 $\pm$ 58	42,5 $\pm$ 29,2	39 $\pm$ 45,1	20 $\pm$ 40	35 $\pm$ 41,2	0
<b>hCG</b>	12 $\pm$ 25	69 $\pm$ 46	94 $\pm$ 2,5	92,5 $\pm$ 5	89 $\pm$ 6,2	65 $\pm$ 44,3	6 $\pm$ 11,5
<b>ARS</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>CONTROL</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>Concentración (%)</b>							
<b>GNRH</b>	0	0,1 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 1,3	1,5 $\pm$ 2	0,3 $\pm$ 1	0,6 $\pm$ 1	0
<b>hCG</b>	0	0,9 $\pm$ 0,6	2,3 $\pm$ 1,9	0,6 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,8	0
<b>ARS</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>CONTROL</b>	0	0	0	0	0	0	0

En cuanto a la especie *Ctenophryne aequatorialis*, solo se obtuvieron resultados de volumen y pH. Se observó un mayor volumen a las 4,5 horas con GNRH y a las 24 horas con hCG. Los tratamientos con Amphians ringer solution (ARS) y Control mostraron mayores resultados a las 3,5 horas. El pH se mantuvo constante en todas las horas de colecta, alrededor de 6 pH.

Estos resultados demuestran la variabilidad en los parámetros espermáticos entre las especies estudiadas y la influencia de las hormonas utilizadas en la colecta espermática. Es importante tener en cuenta estas diferencias al desarrollar estrategias de reproducción y conservación de estas especies de anfibios amenazados, ya que cada especie puede responder de manera única a los tratamientos hormonales.

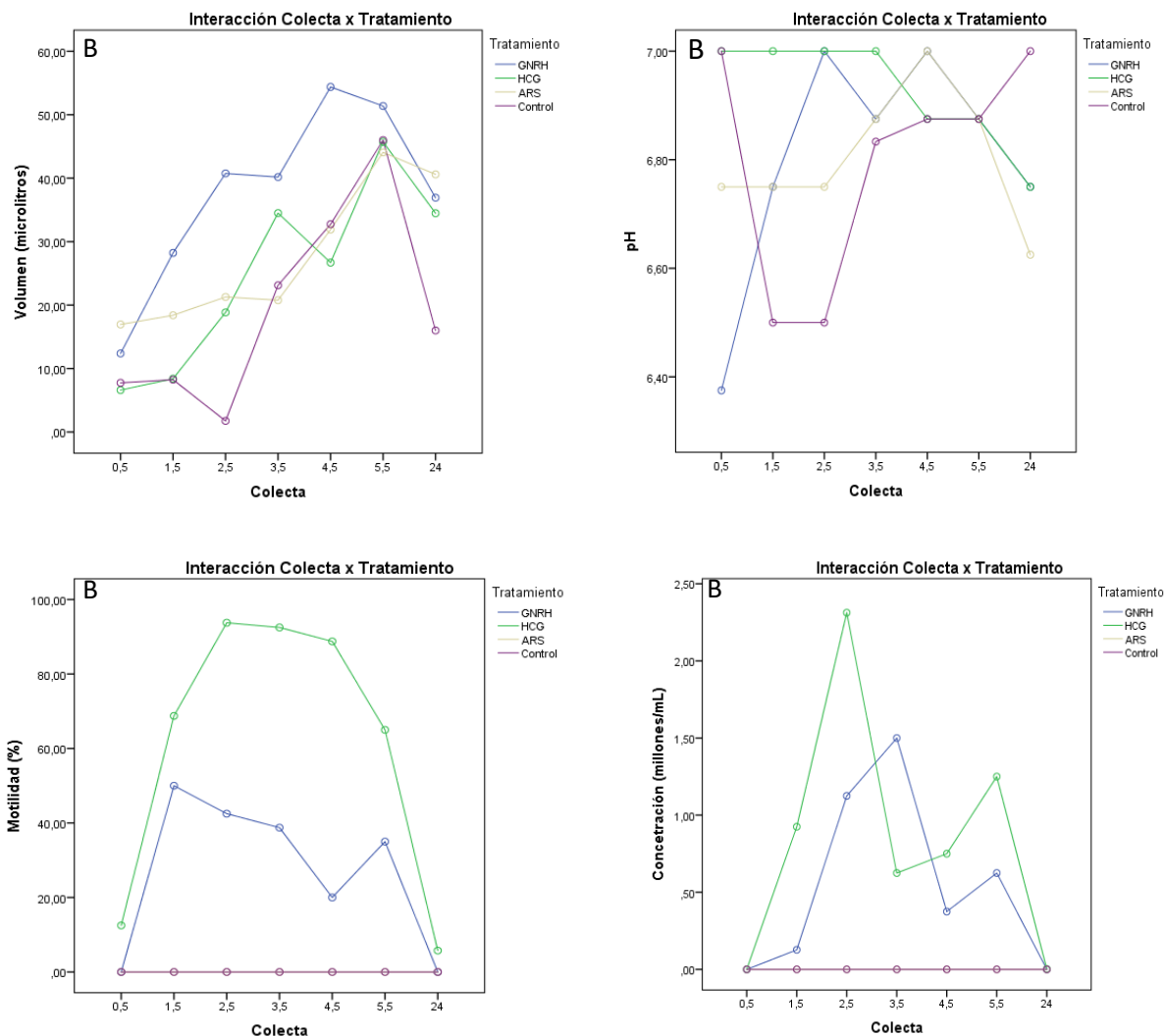
**Figura 1.** Interacción entre el tratamiento y el tiempo de colecta de volumen, pH, motilidad y concentración espermática de *Atelopus nanay*. Se observa un mayor volumen con hCG luego de 24h de aplicación, alcanza una elevación en la motilidad entre las 3.5 h con GnRH y una mayor concentración con hCG a las 3.5h.



Estimaciones de los valores marginales de volumen, pH, motilidad y concentración espermática en *Atelopus nanay*.

De acuerdo con Langhorne (2021), en su estudio con el sapo boreal de las montañas (*Anaxyrus boreas boreas*), observó que los machos respondieron produciendo espermatozoides de manera continua durante un periodo de 5 a 12 horas después de la administración de hCG. Sin embargo, en nuestro experimento con las especies de ranas *Atelopus nanay* y *Atelopus bomolochos*, encontramos patrones de producción de esperma distintos. En el caso de *Atelopus nanay*, la producción de espermatozoides inició a partir de 1,5 horas y se mantuvo hasta las 5,5 horas con un pico de concentración mayor a las 3,5 horas con la hormona hCG. En contraste, en *Atelopus bomolochos*, se observó una producción de esperma en un periodo de tiempo similar, pero con una mayor concentración de espermatozoides a las 2,5 horas con la hormona hCG.

**Figura 2.** Medidas marginales estimadas de volumen, pH, motilidad y concentración espermática de *Atelopus bomolochos*. En estos cuadros se observa un mayor volumen luego de 4.5h con el uso de GnRH, la motilidad se mantiene semi estable entre las 2.5 h y 4.5 h con hCG y un pico de concentración con hCG a las 2.5h.



Estimaciones de los valores marginales de volumen, pH, motilidad y concentración espermática en *Atelopus bomolochos*.

En el estudio realizado por Silla (2019) en la especie de rana *Atelopus zeteki*, se encontró que la dosis utilizada de GnRH-a de 0,4  $\mu\text{g/g}$  de peso no generó una respuesta de espermiación comparable. Es importante destacar que nuestro experimento utilizamos dosis de 5  $\mu\text{g/g}$  de peso de hCG y 4  $\mu\text{g/g}$  de peso de GnRH en las especies de estudio. Estas dosis resultaron exitosas a partir de la segunda y sexta colecta, con una respuesta espermática aceptable. Estos resultados sugieren que la eficacia de las dosis hormonales puede variar entre especies y resaltan la importancia de ajustar las dosis utilizadas en función de las características reproductivas específicas de cada especie de anfibio.

De acuerdo a la argumentación de Silla (2020) en la especie de rana rosada (*Geocrinia rosea*), se observó un aumento significativo en el porcentaje de colecta espermática con la administración de hCG en dosis de 5, 10 o 20  $\mu\text{g/g}$  de peso mediante inyección. Además, el tratamiento hormonal tuvo un efecto significativo en el número de espermatozoides liberados en diferentes momentos (3, 7 y 12 horas). En comparación con nuestro experimento donde utilizamos dosis de 5  $\mu\text{g/g}$  de peso de hCG, y encontramos efectos significativos en nuestras especies de estudio, especialmente con la hormona hCG, a las 2,5 y 3,5 horas.

De igual manera, en el mismo estudio, Silla (2020) también investigó la administración de GnRH en dosis de 1, 5 o 10  $\mu\text{g/g}$  de peso en la especie (*Geocrinia rosea*), observó que esto tuvo un impacto significativo en el porcentaje de concentración espermática en comparación con las ranas que no recibieron ninguna dosis de GnRH. En nuestro experimento, utilizamos una dosis de GNRH de 4  $\mu\text{g/g}$  de peso, lo cual generó un marcado aumento en la concentración de espermatozoides a las 3,5 horas después de la administración de la hormona. Estos hallazgos respaldan la eficacia de la dosis empleada en nuestro proyecto y resaltan la importancia de las hormonas como inductor clave en la producción de espermatozoides en las especies de anfibios estudiadas.

## 5. CONCLUSIONES

La conservación de los anfibios en Ecuador requiere de medidas integrales que aborden la protección de hábitats como la implementación de estrategias reproductivas. La utilización de hormonas como GNRH y hCG ha demostrado ser una herramienta prometedora para la colecta de esperma en estas dos especies de anuros, facilitando la preservación de su material genético.

La aplicación de hormonas GNRH y hCG estimula la producción y liberación de esperma, permitiendo su recolección para su posterior almacenamiento y uso en programas de reproducción asistida. Esta técnica ofrece una alternativa eficiente y ética para aumentar las poblaciones de anfibios amenazados, minimizando el impacto sobre los individuos y sus hábitats naturales.

Sin embargo, es crucial llevar a cabo investigaciones adicionales para optimizar los protocolos hormonales y garantizar la viabilidad y calidad del esperma recolectado. Asimismo, se deben establecer protocolos de manejo adecuados para el almacenamiento y transporte de las muestras, asegurando su viabilidad a largo plazo.

La combinación de conservación *in situ* y *ex situ*, junto con biotecnologías de reproducción innovadoras como la colecta de esperma con hormonas, ofrece perspectivas prometedoras para la protección y recuperación de las especies de anfibios en Ecuador. Estas estrategias deben ser implementadas de manera coordinada y multidisciplinaria, involucrando a científicos, conservacionistas y autoridades, con el objetivo de salvaguardar la rica diversidad anfibia de este país.

## **6. AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo es parte del proyecto “*Implementación de Técnicas de Reproducción Asistida en 3 Especies de Anuros de la Provincia del Azuay*” de la XII CONVOCATORIA ODS de la jefatura de investigación e innovación bajo la codificación PICODS21-01 de la Universidad Católica de Cuenca. Agradecemos a los investigadores del Centro de Conservación de Anfibios de la Fundación AMARU por la colaboración y predisposición en la ejecución del proyecto.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Browne RK, Silla AJ, Upton R, Della-Togna G, Marcec-Greaves R, Shishova NV, Uteshev VK, Proaño B, Pérez OD, Mansour N (2019) Sperm collection and storage for the sustainable management of amphibian biodiversity. *Theriogenology* 133: 187–200.
- Clulow, J., Trudeau, V. L., & Kouba, A. J. (2014). Amphibian Declines in the Twenty-First Century: Why We Need Assisted Reproductive Technologies. In V. L. Trudeau & A. J. Kouba (Eds.), *Reproductive Sciences in Animal Conservation* (pp. 275–316). Springer.
- Clulow, J., Upton, R., Trudeau, V. L., & Clulow, S. (2019). Amphibian assisted reproductive technologies: Moving from technology to application. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1200, 413–463.
- Coloma, L. (2002). Two new species of *Atelopus* (Anura: Bufonidae) from Ecuador. *Elsevier*, 58, 229-252.
- Coloma, L. A., Frenkel, C., Félix-Novoa, C., Quiguango-Ubillus, A. y Varela-Jaramillo, A. 2021. *Atelopus bomolochos* En: Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (Eds). *Anfibios del Ecuador*. Version 2021.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Della, G., Trudeau, V., Gratwicke, B., & Evans, M. (2017). Effects of hormonal stimulation on the concentration and quality of sperm excreted in the critically endangered Panamanian golden frog (*Atelopus zeteki*). *Elsevier*.
- La Marca, E., Labios, K., Lotters, S., & Puschendorf, R. (2005). Catastrophic Population Declines and Extinctions in Neotropical Harlequin Frogs (Bufonidae: *Atelopus*)1. *ResearchGate*, 191-197.
- Langhorne, C., Calatayud, N., & Vance, C. (2021). Efficacy of hormone stimulation on sperm production in an alpine amphibian (*Anaxyrus boreas boreas*) and the impact of short-term storage on sperm quality. *ResearchGate*.
- Ministerio del Ambiente y Agua. 2020. Experiencias del monitoreo biológico de especies focales PARG y Centro de Conservación de Anfibios AMARU. Proyecto Conservación de la Biodiversidad de Anfibios Ecuatorianos y Uso Sostenible de sus Recursos Genéticos - PARG. Quito, Ecuador.
- Ortega Andrade, H., Rodes Blanco, M., Cisneros Heredia, D., Guerra Arevalo, N., López de Vargas-Machuca, K., Armijos Ojeda, D., . . . et al. (2021). Red List assessment of amphibian species of Ecuador: A multidimensional approach for their conservation. *PLoS ONE*. Obtenido de <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0251027>.
- Prieto GB, Velázquez PM. Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas. *Rev Fac Med UNAM*. 2002;45(6):252-257.
- Rodriguez, K., Iglí, A., & Gina, D. T. (2021). Creación de un banco genómico de esperma para la conservación de la rana coronada (*Triprion spinosus*). *Portar le Revistas Académicas UTP*.
- Ron, S., Coloma, L., Frenkel, C., & Novoa, C. (2018). *Ctenophryne aequatorialis*. *Pontificia Universidad Católica del Ecuador*.
- Ron, S. R., Coloma, L. A., Frenkel, C. y Félix-Novoa, C. 2021. *Ctenophryne aequatorialis* En: Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (Eds). *Anfibios del Ecuador*. Version 2021.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Ron, S. R., Coloma, L. A., Frenkel, C., Korfel, C. Félix-Novoa, C., Quiguango-Ubillús, A. y Varela-Jaramillo, A. 2021. *Atelopus nanay* En: Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (Eds).

Anfibios del Ecuador. Version 2021.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador., acceso miércoles, 31 de marzo de 2021.

- Siavichay Pesántez, F., Cáceres Andrade, J. F., Rivera, C. C. M., Guijarro Y María, P., Carrión, E., Parg, P., Incre, L., Del Ambiente, M., & Experiencias, A. (2016). Experiencias en Monitoreo Biológico de Anfibios. Amphibianark.Org. <https://www.amphibianark.org/wp-content/uploads/2021/11/Libro-de-monitoreo-biologico-PARG.pdf>.
- Silla, A. J., & Roberts, J. D. (2012). Investigating patterns in the spermiation response of eight Australian frogs administered human chorionic gonadotropin (hCG) and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRHa). *General and Comparative Endocrinology*, 179, 128–136.
- Silla, A. J., McFadden, M., & Byrne, P. G. (2018). Hormone-induced spawning of the critically endangered northern corroboree frog *Pseudophryne pengilleyi*. *Reproduction, Fertility, and Development*, 30, 1352–1358.
- Silla, A. J., & Byrne, P. G. (2019). The role of reproductive technologies in amphibian conservation breeding programs. *Annual Review of Animal Biosciences*, 7(1), 499–519. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115056>.
- Silla, A. J., McFadden, M. S., & Byrne, P. G. (2019). Hormone-induced sperm-release in the critically endangered Booroolong frog (*Litoria booroolongensis*): effects of gonadotropin-releasing hormone and human chorionic gonadotropin. *Conservation Physiology*
- Silla, A., Roberts, J., & Byrne, F. (2020). The effect of injection and topical application of hCG and GnRH agonist to induce sperm-release in the roseate frog, *Geocrinia rosea*. *Conservation Physiology*, 8(1).
- Trudeau, V., Somoza, G., Natale, G., Pauili, B., Wignall, J., Jackman, P., . . . Schueler, F. (2010). Hormonal induction of spawning in 4 species of frogs by coinjection with a gonadotropin-releasing hormone agonist and a dopamine antagonist. *Reprod Biol Endocrinol* .
- Vu, M., & Trudeau, V. (2016). Neuroendocrine control of spawning in amphibians and its practical applications. *ELSEVIER*, 28-39
- Vú, M., Weiler, B., & Trudeau, V. (2017). Time- and dose-related effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist on reproduction in the Northern leopard frog (*Lithobates pipiens*). *ELSEVIER*.

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL  
REPOSITORIO INSTITUCIONAL**

**Helen Nicole Coronel Sarmiento** portadora de la cédula de ciudadanía N° **0350191862** y **Jefferson Mauricio Zhumi Cajamarca** portador de la cedula de ciudadanía N° **0150765733**. En calidad de autores y titulares de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación "**Aplicación de dos técnicas de estimulación hormonal para extracción espermática en *Atelopus nanay*, *Atelopus bomolochos* y *Ctenophryne aequatorialis***", de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizamos además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 19 de septiembre 2023



**Helen Nicole Coronel Sarmiento**

C.I. **0350191862**



**Jefferson Mauricio Zhumi Cajamarca**

C.I. **0150765733**