UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Análisis correlativo de los niveles de metilación global del ADN y la variabilidad fenotípica, en poblaciones de Rana toro (*Lithobates catesbeianus*, Shaw 1802) viviendo en cautiverio.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Presenta:

BRAULIO AYALA GARCÍA

Tutor principal	**Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina** **Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.**
Comité tutor	**Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse** **Universidad Autónoma de Querétaro.** **Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales** **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.**

Ciudad Universitaria, CDMX. Abril de 2019

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Especialmente para Chio y Cami. También para Juan, mis hermanes en la lucha y a mi hermoso país.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerte mucho Gabriel, por darme la oportunidad de iniciar este proyecto, por confiar en mí, y apoyarme siempre en este camino que sabíamos desde el inicio no sería fácil. Ambos tuvimos la idea y determinación de cuestionar un dogma, y creo que incluso eso nos ayuda y motiva a ser mejores personas, cuestionándonos a nosotros mismos. En lo personal y en lo académico he aprendido mucho de este caminar y siempre estaré muy agradecido. Les agradezco mucho a ustedes Karina y Rogelio, por ayudarme a darle forma a mi proyecto. Su compañía y sabios consejos fueron fundamentales para que todo saliera bien, a pesar de todas las dificultades. En verdad, muchas gracias.

Gracias también Alma, Rogelio, Amanda, Karina, Mauricio y Olivia por abrirme las puertas de sus laboratorios siempre con mucho cariño y amor. Aprendí mucho de ustedes y de sus respectivas familias académicas. Realmente fueron cruciales para poder iniciar y concluir esta etapa. Siempre me sentí como en familia con ustedes, son personas muy especiales. Dr. Jesús Ramírez Santos, Dra. Margarita Gómez Chavarín y T.L.Q. Pablo Pintor Ríos, muchas gracias por su acompañamiento técnico y personal. Definitivamente sus consejos y lecciones ayudaron a que este proyecto pudiera concluir a pesar de mi gran inexperiencia. A mis amigas y amigos de los laboratorios del Inirena, Biomédicas y de Biología Molecular de la FMVZ, también les agradezco por todo cuanto compartimos y me acompañaron.

Agradezco a las personas que me abrieron las puertas de sus invernaderos para trabajar con sus ranas. A la Señora Laura González, a Jimmy Urieta, Héctor Rojas, Mauro Hernández y al señor Toño de Isla de Tzirio.

Clarita y Meche, nunca terminaría de agradecer todo cuanto han hecho por mí. Más allá de hacer su trabajo con una dedicación excepcional, siempre me sentí acompañado, comprendido y apoyado en un plano personal y con mucho cariño. Con ustedes no sólo pude sobrevivir a la burocracia, si no que compartimos alegrías y frustraciones. Son lo máximo, nunca las olvidaré. Araceli y Dr. Librado, también gracias por todo el apoyo administrativo y perdón por darles tantos problemas.

Gracias Cami, Aldo y Chalma por acompañarme en mis muestreos y experimentos, así como en tantas pláticas que han contribuido a mi desarrollo personal y académico. A Ceci por la ayuda con los conteos. También a Héctor por apoyarme económica y moralmente en la recta final.

También agradezco al Posgrado en Ciencias de la Producción y Salud Animal y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por darme la oportunidad de estudiar mi posgrado y haber tenido una beca. Reconozco que ambas cosas son un invaluable privilegio.

¡TLAZOHKAMATI!

RESUMEN

La teoría neo-darwinista sostiene que la fuente de variación fenotípica más importante proviene de cambios en la secuencia genética. Sin embargo, nueva evidencia indica que existen más mecanismos moleculares que subyacen la divergencia fenotípica entre poblaciones de una misma especie. La metilación del ADN, un mecanismo de regulación epigenética, cumple dicha función. Los niveles de metilación en regiones específicas o en todo el genoma, determinan la plasticidad fenotípica en todos los vertebrados. Para poner a prueba este nuevo modelo, el presente trabajo tuvo el objetivo de analizar la correlación que existe entre la variabilidad fenotípica y los niveles globales de metilación de ADN circulantes en sangre, en distintas poblaciones en cautiverio de Rana toro (*Lithobates catesbeianus*). Se analizó la morfometría geométrica, la morfometría lineal, la condición y tamaño corporal, la hematología y la respuesta inmunitaria innata, en función de la metilación global del ADN en muestras de sangre. Se trabajó con ranas adultas y juveniles de cinco poblaciones diferentes viviendo en invernaderos. Lo que se encontró fue una alta variabilidad en los rasgos morfométricos, tanto lineales como geométricos, así como en los rasgos fisiológicos excepto por la prueba inmunitaria. Estas respuestas fenotípicas variaron de acuerdo a la localidad de muestreo, la edad y el sexo de los animales. El dimorfismo sexual que esta especie expresa en diferentes rasgos, se comportó de manera distinta entre las poblaciones. Sin embargo, ninguna de las variables estudiadas, estuvo correlacionada con los niveles globales de metilación de ADN. Este hallazgo no concuerda del todo con estudios previos, aunque la variabilidad fenotípica expresada sí es similar a la que se encuentra en otros anuros. No se puede descartar que la metilación del ADN participe en la variabilidad fenotípica de esta u otras ranas, por lo que es necesario usar distintas metodologías para continuar explorando este fenómeno.

ABSTRACT

The modern synthesis of evolution holds that genetic variability is the most important source of phenotypic variation. However, recent evidence has shown that more molecular mechanisms underlie phenotypic divergence between populations of the same species. DNA methylation, an epigenetic mechanism, is one of those. DNA methylation levels in both specific loci, or global genomic levels, promote phenotypic plasticity in vertebrates. To support this new model, the present work has the objective of analyzing the correlation between phenotypic variability and global DNA methylation in blood of captive bred Bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). Phenotypic variability was evaluated by lineal and geometric morphometrics, body size and condition, hematology and innate immunocompetence in juvenile and adult frogs living in five different greenhouses were used. A high variability, in terms of lineal and geometric morphometrics, as well as physiological variation was found. The phenotypic trait variability depends on the locality, age and sex of frogs, as well as on the interaction of those variables. Sexual dimorphism of distinct traits was different among populations. However, no correlation was found between any variable and the global content of DNA methylation. This findings are at odds with previous findings, although the phenotypic variability was similar with that of other anurans. The possibility that DNA methylation, participates in phenotypic divergence cannot be ruled out, so that different methodological strategies are needed.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....II

AGRADECIMIENTOS.....III

RESUMEN.....IV

ABSTRACT.....V

INTRODUCCIÓN.....10

Planteamiento del problema.....10

Modelo teórico alternativo.....12

Planteamiento de la estrategia.....14

Objetivo general.....17

Objetivos particulares.....17

ANTECEDENTES.....18

Evidencia al modelo teórico.....18

Modelo de trabajo.....22

Metilación global del ADN.....22

La rana toro como modelo de estudio.....24

PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO.....26

Caracterización de la especie de estudio.....26

Localidades de muestreo y colectas.....27

Animales.....28

CAPÍTULO 1.....30

Caracterización de la variabilidad morfométrica del fenotipo de ranas toro (*L. catesbeianus,* Shaw 1802) viviendo en cautiverio en localidades diferentes.....30

Metodología.....31

Morfometría lineal.....31

Morfometría geométrica.....32

Análisis estadísticos y software.....33

Resultados.....34

Análisis morfométrico lineal.....34

Morfometría geométrica.....36

Discusión.....38

Conclusiones.....42

CAPÍTULO 2.....43

Caracterización de la variabilidad fenotípica en la fisiología de ranas toro (*L. catesbeianus*) viviendo en cinco localidades diferentes.....43

Metodología.....44

Condición corporal.....44

Hematología.....45

Desafío inmunitario.....45

Análisis estadístico y software.....46

Resultados.....47

Análisis de la condición corporal.....47

Hematología.....50

Desafío inmunitario.....51

Discusión.....53

Conclusiones.....58

CAPÍTULO 3.....60

Estudio correlativo los niveles de metilación global de ADN, en muestras de sangre de ranas de las distintas localidades.....60

Abstract.....61

Introduction.....62

Materials and methods.....63

Results and discussion.....65

Acknowledgements.....67

References.....68

CONCLUISIONES Y CONSIDERACIONES FINALES.....70

Aspectos moleculares de la metilación del ADN.....87

Sobre la naturaleza, y función de la metilación del ADN.....87

La función de la MET en las células.....89

La función de la MET en el desarrollo del fenotipo.....91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localidades de muestreo de Rana toro.....29

Figura 2. Localización de los puntos de referencia para la morfometría geométrica.....33

Figura 3. Análisis de Componentes Principales de la morfometría lineal en ranas toro.....35

Figura 4. Análisis canónico discriminante de la morfometría geométrica del cráneo de ranas toro.....37

Figura 5. Condición corporal de hembras y machos adultas.....48

Figura 6. Condición corporal de ranas juveniles.....48

Figura 7. Tamaño corporal de ranas toro de LP y SPT.....49

Figura 8. Relación del peso y la talla en ranas de LP y SPT.....50

Figura 9. Respuesta inflamatoria a la administración subcutánea de PHA.....51

Figura 10. Figure 1.....66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de condición corporal y tamaño.....47

Tabla 2. Análisis hematológico de ranas juveniles de un año de edad.....52

Tabla 3. Table 1. Hematological parameters.....67

INTRODUCCIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los fenómenos que principalmente trata de comprender la biología es la diversidad de especies que han habitado y habitan hoy en día el planeta, tratando de comprender su historia evolutiva. La existencia de la evolución en el mundo orgánico ya no es una hipótesis, es un hecho. La entendemos de manera general, como el cambio de las características anatómicas, fisiológicas, genéticas, de comportamiento, comunicación, etc. que hace que especies nuevas deriven de ancestros en común a través del tiempo(Futuyma, 1998). Desde comienzos del siglo XIX, se han generado distintas teorías que han ayudado a comprender diversas manifestaciones del mismo fenómeno, y en la actualidad no es menor el esfuerzo dedicado a descubrir sus causas y mecanismos. Jean Baptiste Lammarck y Charles Darwin (junto con Alfred Rusell Wallace), fueron los primeros en proponer teorías formales sobre cómo es que nuevas especies se originan(Gould, 2002). La teoría de la evolución por selección natural de Darwin, sin embargo, fue la más aceptada entre la comunidad ya que hasta hace poco, había sido la más completa y de la que más se había encontrado evidencia. Además de la selección natural como mecanismo de cambio evolutivo, la teoría darwiniana descansa sobre dos pilares conceptuales. Por un lado, el cambio de las las características en un conjunto de organismos a lo largo del tiempo, y por otro, la divergencia entre poblaciones de una misma especie (o entre especies), que ocurre por la herencia y acumulación (lenta y gradual) de estos mismos cambios de características. (Futuyma, 1998). Sin embargo, Darwin no pudo proponer un mecanismo que explicara cómo surge nueva variación en los rasgos de las especies ni tampoco de qué manera se heredaban los rasgos. La teoría sintética de la evolución, también llamada Neodarwinismo, fue la que casi un siglo más tarde ofreció un mecanismo para ambos, cubriendo así un hueco importante vacío en el modelo teórico de Darwin (Jablonka and Lamb, 2005).

La síntesis de la teoría evolutiva sostiene (junto con otros principios no considerados aquí) que el fenotipo de un organismo está determinado por su genotipo (conjunto de genes), y que las diferencias fenotípicas entre organismos de una misma especie o de especies diferentes, se deben a diferencias genéticas y en menor medida por

el ambiente. También sostiene que la herencia de los rasgos fenotípicos ocurre a través de la información contenida en los genes y la variación de éstos se debe a mutaciones. A las variantes provocadas por estas mutaciones se les conoce comúnmente como alelos (Futuyma, 1998). Esta concepción centrada en los genes, trajo un paradigma, muy bien ejemplificado en la frase de Mayr: "ante los ojos de la síntesis moderna, la evolución de dos o más especies que provienen de un ancestro en común ocurre por la divergencia genética entre poblaciones que habitan geografías distintas" (2013).

Décadas más tarde se descubrió que la información contenida en los genes, es codificada en la secuencia de nucleótidos en el ADN. Desde entonces, la idea que ha predominado el pensamiento biológico es que la única fuente intrínseca de variación de las características fenotípicas, son los cambios en la secuencia de nucleótidos. Además, que estos cambios están aislados del efecto del ambiente y de la historia ontogenética de un organismo al estar dentro de la línea germinal(Jablonka and Lamb, 2005). Sin embargo, existe evidencia de que esta hipótesis es incorrecta. Por ejemplo, se sabe que durante el desarrollo embrionario se originan los diferentes rasgos fenotípicos en organismos multicelulares, y cambios en los procesos ontogenéticos generan variaciones fenotípicas. Los niveles y el tiempo de expresión de genes morfogenéticos en peces, puede provocar alteraciones en su esqueleto y en la morfología de sus miembros (Sakamoto et al., 2009). Cambios de este tipo durante la ontogenia, se sabe pueden perdurar por varias generaciones (Carroll, 2008). Por otro lado, el metabolismo y la fisiología celular también determinan la manera en la que los genes se activan, pudiendo así modificar el fenotipo (Shafer et al., 2011). En este sentido, la señalización redox de las mitocondrias durante el desarrollo de muchos metazoarios es determinante para el establecimiento de los ejes corporales (Coffman and Denegre, 2007). Por otra parte, diversos factores ambientales como la dieta o la temperatura, sobre un organismo en desarrollo puede alterar su fenotipo y el de varias generaciones posteriores (Norouzitallab et al., 2014a). Durante la 2ª guerra mundial hubo una hambruna en Holanda, y las personas que se desarrollaban embrionariamente durante ésta, además de expresar toda una diversidad de desórdenes metabólicos y problemas de salud, también los heredaron a sus hijos (Painter et al., 2008). De manera similar, existen rasgos o caracteres adquiridos por una generación que se pueden heredar. Tal es el caso de una respuesta anti-viral de ARN, que producen las células somáticas del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, que puede heredarse transgeneracionalmente a través de la línea germinal a cinco generaciones (Rechavi et al., 2011b). Estos y muchos otros hallazgos, han llevado a cuestionar la vigencia de la teoría sintética de la evolución, en especial, los mecanismos que plantea como fuente de

variabilidad y de herencia. Esto genera la necesidad de proponer un nuevo modelo teórico, capaz de dar más respuestas a fenómenos aún incomprendidos. Numerosos descubrimientos en diversas áreas de la biología han ayudado a comprender que si bien, la secuencia genética es una importante fuente de variación y herencia, no es la única ni la más importante. Existen otros mecanismos que subyacen la variabilidad y la transmisión de ésta, que ayudan a comprender de mejor manera, la historia evolutiva de los organismos sobre la tierra (Jablonka and Lamb, 2005).

MODELO TEÓRICO ALTERNATIVO

Los mecanismos de regulación epigenética (MRE), presentes dentro y fuera del núcleo, son un sistema complejo de proteínas y ácidos nucleicos que interactúan con el genoma y regulan su expresión. Participan en prácticamente todos los procesos celulares de organismos eucariotas y procariotas. El prefijo "epi" hace referencia a que funcionan "por encima" de la información codificada en los genes, determinando todos los linajes celulares en un organismo multicelular. Los mecanismos hasta ahora descritos son la metilación del ADN, la regulación de la compactación de la cromatina a través de histonas y la regulación por moléculas de ARN no codificante (para una revisión *in extenso* de todos los mecanismos, se puede consultar Tollefsbol, 2010) (Goldberg et al., 2007). Todos estos actúan de manera coordinada en prácticamente cualquier proceso de regulación de la expresión del genoma y su regulación (Hannon, 2002; Jaenisch and Bird, 2003). También participan en procesos cruciales como la conformación de cada fenotipo celular en un organismo (Shipony et al., 2014), también en el desarrollo embrionario (Ruzov et al., 2004), la plasticidad celular (Baerwald et al., 2016) y la herencia de caracteres fenotípicos (de Boer et al., 2010), por citar algunos.

La metilación del ADN es el mecanismo más estudiado, y del que se conocen mejor su naturaleza, función e implicaciones biológicas y evolutivas. Regula la transcripción del genoma, por medio de la modificación bioquímica de la base nitrogenada citosina, que recibe un grupo metilo en la posición 5 de su anillo de carbón, resultando en 5-metilcitosina (Zhang, 2011). La metilación de ADN regula una gran diversidad de procesos a diferentes escalas, celular, tejido, órganos, individuo, comportamiento, etc. Regula la diferenciación celular al propagar mitóticamente los estados de activación o represión de

todo el genoma, incluyendo secuencias codificantes y no codificantes. También controla la diferenciación celular, y es vital para el desarrollo de cualquier estructura y función en hongos, plantas, animales e incluso protozoarios (Katoh et al., 2006; Law and Jacobsen, 2010). Fenómenos como la impronta genética y la inactivación de cromosomas completos también ocurren por medio de este MRE (Mager et al., 2003; Fan, 2011). Promueve variabilidad fenotípica en ausencia de variación genética, integrando información del medio ambiente externo e interno, en un proceso mejor conocido como plasticidad fenotípica (Massicotte and Angers, 2012). Por ejemplo, el fenotipo de gorriones comunes (*Passer domesticus*) puede verse alterado en diferentes condiciones ambientales, y esto se asocia con cambios en los niveles de metilación del ADN en diferentes loci (Liebl et al., 2013). Por otro lado, es fundamental para mantener silenciados todos los elementos transponibles dentro de los genomas (Jursch et al., 2013). Por último, este sistema de regulación también se hereda meióticamente, transmitiendo información sobre la regulación del genoma en cada generación (Anway and Skinner, 2008). Por ejemplo, se pueden observar efectos transgeneracionales (que ocurren en al menos tres generaciones subsecuentes) en el metabolismo y la coloración del pelaje de ratones, provocados por la exposición a dietas enriquecidas o deficientes en folatos durante el desarrollo, mismas que modifican los niveles de metilación en diferentes tejidos (Aiken et al., 2016).

Los hallazgos antes mencionados han llevado a proponer que la metilación del ADN subyace la variación y herencia fenotípica, necesarias para la evolución de nuevas especies (Varriale, 2014). Esta nueva hipótesis, ayuda a poder explicar fenómenos evolutivos de grandes implicaciones en la biología, como la herencia Lamarckiana o de caracteres adquiridos (proceso anteriormente descartado por supuesta falta de evidencia) (Vargas, 2009). De igual manera, aporta una explicación mecanistica tanto para la evolución gradual o Darwiniana, como para la evolución puntuada, *sensu* S.J. Gould (Zeh et al., 2009). También ayuda a entender cómo los eventos que ocurren durante el desarrollo de los organismos, repercuten en la historia evolutiva de las especies (Skinner, 2011b), además de dar luz sobre cómo ocurre la evolución de la complejidad de los genomas (Kazazian, 2004). Sin embargo, este nuevo modelo teórico de variación epigenética aún debe ser puesto a prueba para que obtenga más validez y aceptación.

PLANTEAMIENTO DE LA ESTRATEGIA

La metilación global del ADN, o la proporción de citosinas metiladas en un genoma, influye en la conformación fenotípica de un organismo, también determina procesos fisiológicos, y participa en procesos evolutivos dentro de todas las diferentes clases de vertebrados (Varriale, 2014). Los niveles de metilación global (NMG) en diferentes tejidos de peces y anfibios son el doble de los hallados en reptiles, aves y mamíferos. Este hecho ha llevado a pensar que una disminución en los niveles globales de metilación de ADN, estuvo relacionada a la transición al medio terrestre, o transición "del frío al calor" de los tetrápodos (Jabbari et al., 1997). De manera similar, los monotremas exhiben niveles más altos de NMG que los marsupiales o placentarios (Varriale, 2014). Por otra parte, la temperatura del agua afecta los NMG, ya que peces marinos viviendo más cerca a los polos, exhiben NMG más bajos que los que viven en aguas tropicales. De hecho, peces relacionados filogenéticamente pueden tener diferencias marcadas en los NMG, al estar expuestos a diferentes temperaturas (Varriale and Bernardi, 2006a). En este sentido, la metilación global del ADN es un proceso mediante el cual nueva variabilidad fenotípica puede emerger (Vanyushin et al., 1973; Jabbari et al., 1997). Los NMG, también han sido estudiados en el contexto de la salud humana. Se ha reportado que los NMG en la sangre tienen una correlación con la actividad física (Zhang et al., 2011b), así como con los perfiles glicémicos y lipídicos (Pearce et al., 2012). También es un marcador para algunos tipos de cáncer (Hsiung et al., 2007). Se relacionan negativamente con la exposición a contaminantes orgánicos persistentes y del aire, así como al benzeno(Bollati et al., 2007; 2010; De Prins et al., 2013).

Los anfibios son un grupo diverso de vertebrados en el cual se observan fenómenos evolutivos interesantes. Su ontogenia es compleja, por sus fases de vida, larvaria, metamorfosis y una fase adulta, que por lo general tiene hábitos distintos a la larvaria (Halliday and PA, 1988). Al estar expuestos a factores ambientales tan diversos a lo largo de su vida, el efecto que el medio ambiente puede tener sobre su fenotipo es muy complejo (Miaud et al., 1999). Por tal motivo, los anfibios son un grupo muy atractivo para conocer los efectos del medio ambiente sobre la variabilidad fenotípica, a través de mecanismos epigenéticos como la metilación de ADN. Sin embargo, es uno de los grupos de vertebrados en donde menos se ha explorado este fenómeno. Las ranas *Xenopus laevis* y *X. tropicalis*, son las dos especies en donde se concentran casi todos los estudios en este sentido, y casi todos éstos se han llevado a cabo en laboratorio por su virtud como modelos de investigación. La rana toro (*Lithobates catesbeianus*) por su lado, aunque se

usa principalmente para consumo humano, tiene muchas ventajas para estudios ecológicos (Rocha and Branco, 1998; Hammond et al., 2015). Es una especie altamente plástica, capaz de vivir y adecuarse a muchos diferentes ambientes. Ha colonizado casi todos los continentes y en México se le puede encontrar en cautiverio y en vida libre (Ficetola et al., 2006). Habita zonas de bosque muy frías en Canadá donde el suelo se congela en buena parte del año, así como en zonas ecuatoriales con condiciones de temperatura y humedad muy elevadas(Govindarajulu et al., 2006; Boelter and Cechin, 2007). Aunque se conoce su gran capacidad plástica, la diversidad genética en poblaciones introducidas en Asia y Europa es muy reducida. Esto es causado principalmente por efectos fundadores y cuellos de botella (Ficetola et al., 2008; Bai et al., 2012). Este hallazgo indica que otra fuente de variación distinta a la genética es responsable por la divergencia fenotípica presente en esta especie. La mayoría de las poblaciones introducidas en México, han existido durante menos de 100 años (Reynoso, 2009). Esto también lleva a pensar que la diversidad genética CORí, no sea muy alta, y tendría que haber un mecanismo distinto, responsable de generar toda esta variabilidad fenotípica.

Tomando en cuenta la evidencia sobre el efecto de la metilación del ADN en la variabilidad fenotípica de vertebrados, es atinado creer que este mismo mecanismo de regulación epigenética participa en la variación fenotípica que ocurre en la rana toro. Más aún, considerando lo que se conoce sobre el gorrión *P. domesticus*, en cuanto a que también es una especie invasiva, altamente plástica, y que compensa su baja diversidad genética con un incremento en la diversidad epigenética(Schrey et al., 2012; Liebl et al., 2013), es muy posible que la variabilidad fenotípica que expresa la Rana toro, se deba a cambios en la metilación del ADN. Por otro lado, en muchos países donde ha sido introducida, como en México, comienza a ser domesticada dentro de invernaderos rústicos. En peces, aves y mamíferos, se ha descrito cómo la domesticación y la crianza en cautiverio afectan la variabilidad fenotípica, y disminuyen la diversidad genética por efectos fundadores, endogamia y factores ambientales, similar a lo que ocurre con *P. domesticus* (Kostow, 2004; Jiang et al., 2005; Allowen Evin, Keith Dobney, Renate Schafberg, Joseph Owen, Una Strand Vidarsdottir, 2015). En este sentido, estos sistemas de producción, brindan una buena oportunidad para estudiar procesos de divergencia fenotípica provocados por la domesticación. También es importante considerar que los niveles de metilación global se modifican por diversos factores ambientales, (Niculescu and Zeisel, 2002; Varriale and Bernardi, 2006a), Sobre todo, porque en estos sistemas rústicos, la variabilidad de la temperatura en el interior puede ser muy alta y poco controlada, dependiendo del manejo completamente manual y de la ubicación geográfica.

En la rana toro, esta variabilidad trae consigo diferencias fenotípicas marcadas que aún no han sido estudiadas (Urieta, com.pers.). Por todo lo antes dicho, se llegó a la hipótesis de que los cambios en los niveles de metilación global, subyacen la variabilidad fenotípica que expresan ranas toro viviendo en diferentes localidades en condiciones de cautiverio. Hasta la fecha, sólo un estudio ha evaluado los niveles globales de metilación en esta especie, y sólo de manera descriptiva junto con muchos otros vertebrados(Jabbari et al., 1997). Una buena estrategia para apoyar o refutar esta hipótesis fue medir los niveles de metilación en sangre, ya que los anfibios cuentan con eritrocitos nucleados (Allender and Fry, 2008), y la mayoría de los estudios que se han llevado a cabo en reptiles(Varriale and Bernardi, 2006b), peces(Varriale and Bernardi, 2006a), mamíferos(Gama-Sosa et al., 1983) y en humanos(Rusiecki et al., 2008), lo han hecho con muestras de este tipo.

Explorar este planteamiento contribuye a un importante debate en la biología evolutiva que actualmente ha tomado fuerza e importancia. Hoy en día, se busca transformar el modelo hegemónico de la síntesis moderna centrada en el gen y la selección natural, para construir una nueva síntesis expandida, que incorpore a nuevas formas de herencia no genética, a la plasticidad fenotípica y el desarrollo como mecanismos fundamentales en la evolución (Laland, 2017). Entonces, es vital contribuir con estudios que promuevan la discusión y el análisis crítico de los fenómenos evolutivos. Por otro lado, este trabajo también aporta información valiosa sobre la capacidad invasiva de la rana toro en territorio mexicano. Si bien se han reportado poblaciones introducidas, a la fecha no se ha documentado el potencial que tienen las poblaciones que viven en cautiverio de colonizar nuevos hábitats, en el caso de que sean liberadas accidentalmente.

Por todos los antecedentes antes expuestos, el presente estudio tuvo el siguiente:

OBJETIVO GENERAL

Analizar la correlación que existe entre la variabilidad fenotípica y los niveles globales de metilación de ADN circulantes en sangre, en distintas poblaciones en cautiverio de rana toro (*L. catesbeianus*).

OBJETIVOS PARTICULARES

Analizar la variabilidad fenotípica morfométrica en el cuerpo y cráneo de ranas toro (*L. catesbeianus*) viviendo en localidades diferentes.

Estimar la variabilidad fenotípica entre las localidades a través de rasgos hematológicos, de condición corporal y de inmunología.

Medir los niveles de metilación global de ADN, en muestras de sangre de ranas de las distintas localidades.

ANTECEDENTES

La información sobre la naturaleza bioquímica y molecular de la metilación del ADN, se encuentra en el Apéndice 1. En éste también se pueden encontrar sus funciones dentro de la célula, en la fisiología y desarrollo de vertebrados.

EVIDENCIA AL MODELO TEÓRICO

El desarrollo es una ventana temporal importante para el efecto del medio ambiente sobre el fenotipo a través de modificar la metilación del ADN. La exposición prenatal a la terrible hambruna que se vivió en Holanda durante la segunda guerra mundial es tal vez el efecto epigenético ambiental más conocido. Este evento afectó a los adultos que en ése momento se desarrollaban, provocando bajo peso al nacer, obesidad, diabetes, enfermedad coronaria y cáncer de mama (Stein et al., 2004; Diniz-filho, 2008). Todos estos padecimientos, vistos como alteraciones fenotípicas, se vieron asociados con alteraciones en los niveles de metilación del ADN, por ejemplo en el gen IGF2 (Heijmans et al., 2008). En el caso de los polifenismos de las abejas, también hay un control epigenético del fenotipo. Cuando larvas de abeja se alimentan de jalea real, se convierten en abejas reinas reproductivas, mientras que cuando se ingieren jalea común, resultan en abejas obreras. Este fenómeno puede ser emulado sólo al slienciar la enzima DNMT3(Kucharski et al., 2008). Por otro lado, el gen A(vy) es el mayor responsable de la coloración parda del pelaje de ratones Agouti, y dependiendo de su expresión, aumenta la propensión a tumorigénesis y a que se vuelvan obesos (Dolinoy et al., 2007). Se sabe que el nivel de metilación dentro del retrotransposon “partícula intracisterna A” (IAP) modula la expresión de este gen (Walsh et al., 1998), y recientemente se descubrió que el bisphenol A (BPA) disminuye la metilación de IAP, generando a su vez una disminución de la expresión del gen A(vy). El resultado en el fenotipo de la progenie es una coloración del pelaje amarilla y el desarrollo de obseidad. De manera interesante, la suplementación de la dieta con donadores de grupos metilo, como el ácido fólico a vitamina B12, contrarrestaron el efecto del BPA(Dolinoy et al., 2007). Otros factores como el estrés (Champagne and Curley, 2009) contaminantes(Kundakovic and Champagne, 2011),

metales pesados(Martínez et al., 2011; Bakulski et al., 2012), el abuso de substancias como el alcohol y tabaco(Otero et al., 2012) han demostrado tener efectos en la salud de personas adultas por medio de alterar los niveles de metilación del ADN.(Norouzitallab et al., 2014a)

Aunque está muy poco estudiado, se sabe que la metilación de ADN contribuye a la variación fenotípica natural. Aún cuando no existe variación genética, la metilación del ADN puede modificar el fenotipo a través de procesos como la plasticidad fenotípica (Snell-Rood et al., 2013). El pez clonal, *Chrosomus eso-neogaeus*, del que se pueden encontrar individuos genéticamente idénticos en diferentes ambientes, expresa una diversidad fenotípica que se debe a la existencia de epialelos. A diferencia de los alelos genéticos, éstos son variantes del nivel de metilación en determinadas citosinas, que incrementan o disminuyen la expresión de un gen en diferentes tejidos y diferentes individuos (Massicotte et al., 2011). En este caso, la alta variabilidad en la metilación del ADN, se ha visto asociada al pH del agua en donde viven (Massicotte and Angers, 2012). En la trucha común (*Oncorhynchus mykiss*), el proceso de esmoltificación, también conocido como esguinado (proceso mediante el cual la morfología, comportamiento y fisiología de individuos juveniles cambia en función de la migración hacia agua salada del mar), ocurre por cambios en la metilación del ADN. En esta especie se pueden observar dos fenotipos, uno residente que no migra hacia el mar y el migratorio (en el que ocurre la esmoltificación). Entre ambos fenotipos se han reportado diferencias en los patrones de metilación en 57 sitios a lo largo de su genoma. El 62% de éstos, tiene relación con el tipo de fenotipo y cerca de la mitad de toda esta situada en regiones de regulación transcripcional (Baerwald et al., 2016). Por otro lado, en escarabajos cornudos (género *Onthophagus*), cambios en la metilación del ADN llevan a que larvas de esta especie puedan aclimatarse a una gran variabilidad en su nutrición, modificando su talla corporal de adultos (Snell-Rood et al., 2013). En otro estudio se encontraron muchos genes con distintos niveles de metilación que contribuyen a la variación fenotípica en tres poblaciones humanas, caucásico-americana, afro-americana y chino-americana. Al identificar los genes, se encontró una asociación de la metilación con la susceptibilidad a ciertas enfermedades (como cáncer, diabetes, enfermedad de Parkinson, así como infección con los virus HIV y hepetitis B), la susceptibilidad a patógenos y la respuesta a drogas y factores ambientales. Cabe notar, que de toda la variación epigenética encontrada, el 30% no se encuentra relacionada a diferencias genéticas (Heyn et al.,

2013). Por otro lado, la metilación global de ADN, se ve asociada al género, pero no a la edad ni a las hormonas sexuales en sangre de humanos sanos. En el caso de los hombres, es en donde se observan niveles más altos de metilación(El-Maarri et al., 2011).

Estudios recientes, han ayudado a comprender cómo es que la metilación del ADN contribuye a los procesos evolutivos en escalas de tiempo ecológico, independientemente de la diversidad genética. El gorrión común *Passer domesticus* es originario de Europa, pero ha ampliado su rango de distribución a casi todos los continentes al ser trasladado por humanos (Long and Agriculture Protection Board of Western Australia., 1981). La divergencia fenotípica entre poblaciones introducidas en Brasil es alta, si se toma en cuenta la morfometría y la coloración de plumas. Esta divergencia fenotípica, está presente entre éstas y otras poblaciones europeas. Sin embargo, la variabilidad fenotípica encontrada no se relaciona con la diversidad genética de las poblaciones (Lima et al., 2012). En otro estudio se encontró que la fuente de variación de rasgos morfológicos y fisiológicos, como la condición corporal, el crecimiento y la respuesta del sistema inmunitario innato en juveniles, se debe a un componente ambiental y no a uno genético (Kinnard and Westneat, 2009). También se ha encontrado que la metilación de ADN en gorriones introducidos varia dentro y entre poblaciones, especialmente donde la diversidad genética es baja (Schrey et al., 2012). Por último, también se ha encontrado que a lo largo de su rango de expansión, la diversidad epigenética se correlaciona negativamente con la diversidad genética y positivamente con la endogamia. Toda esta evidencia sugiere que la metilación del ADN compensa la pérdida de diversidad genética en poblaciones introducidas, promoviendo variación y plasticidad fenotípica en respuesta a nuevos ambientes. También sugiere que la metilación de ADN es un importante mecanismo que subyace cambios fenotípicos en una escala de tiempo ecológica (Liebl et al., 2013).

Los MRE como la metilación de ADN, subyacen la herencia transgeneracional de rasgos fenotípicos. Este tipo de herencia es importante porque permite que la variación producida por efectos del medio ambiente se integre al fenotipo de una especie y ocntribuya a su evolución (Jablonka et al., 1992). Durante el desarrollo de animales ocurre una reprogramación de la metilación de ADN, en la que los patrones de metilación en los gametos, se eliminan casi por completo durante las primeras rondas de división celular, y se reestablecen durante la etapa de morulación. Sin embargo, esta reprogramación no

evita que nuevos patrones de metilación sean incorporados y heredados a nuevas generaciones (Skinner, 2015). Este mecanismo es un componente constitutivo en la herencia no genéticaa. En el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, el tiempo de vida puede ser regulado por diferentes factores. Uno de ellos es un complejo remodelador de la cromatina que se caracteriza por contar con histonas H3 trimetiladas en la lisina 4 (H3K4me3). La depleción de esta marca epigenética sólo en la generación F1, provoca un incremento del 20% en el tiempo de vida de individuos de las generaciones subsecuentes hasta la F4 (Greer et al., 2011). Por otro lado, la expresión exógena del virus Flock House en células somáticas de este nemátodo, genera la herencia de una respuesta antiviral hasta la 5 generación después del primer estímulo (Rechavi et al., 2011a). En *Drosophila melanogaster*, la exposición embrionaria al antibiótico G418, genera resistencia en los individuos que no mueren. Este efecto está mediado en gran parte por la expresión de genes pertenecientes al grupo Polycomb, y dicha repsuesta se hereda hasta la generación F9, aún cuando sólo la primer generación recibió el estímulo (Stern et al., 2012). Por otro lado, al exponer a una generación parental de *Artemia* a choques no letales de calor, se incrementa la producción de la proteína de choque térmico 70 (Hsp70), se incrementa la tolerancia al estrés térmico y se genera una resistencia a la bacteria patogénica *Vibrio campbelli*. Estas respuestas son heredadas por tres generaciones sin volver a exponerse al estímulo original, y están asociadas con niveles alterados de metilación de ADN global, y la acetilación de las histonas H3 y H4 (Norouzitallab et al., 2014a).

En mamíferos se conoce con más detalle este fenómeno de herencia epigenética transgeneracional. El fungicida Vinclozolina, tiene efectos como disruptor endócrino en un número de especies y es capaz de reprogramar el epigenoma de ratones (Anway et al., 2008). Recientemente se descubrió que al exponer ratones hembra gestantes a este xenobiótico, durante la fase de determinación sexual, se modifica la metilación de ADN de las tres generaciones subsecuentes. En el genoma de paterno y el materno, las modificaciones se presentan de manera diferente (Stouder and Paoloni-Giacobino, 2010). Este compuesto también es capaz de alterar el transcriptoma de células germinales de ratones macho hasta la generación F3, influenciando la expresión de 196 genes, incluyendo los genes de las enzimas metiltransferasas (Anway et al., 2008). Efectos similares también han sido reportados con la exposición embrionaria al pesticida metoxiclor (Manikkam et al., 2014) y a la dioxina (Somm et al., 2012).

En resumen, los cambios en los niveles de metilación de ADN, que ocurren de manera global o en regiones específicas, son un mecanismo mediante el cual nueva variación fenotípica emerge. Los patrones de metilación de ADN son heredados, entonces también es un mecanismo que subyace la heredabilidad de los cambios fenotípicos. Entonces, toda esta evidencia apoya fuertemente el modelo teórico presentado anteriormente, y apoya el estudio de fenómenos similares en otras especies.

MODELO DE TRABAJO

METILACIÓN GLOBAL DEL ADN

La metilación global del ADN (MGA) es la proporción de citosinas metiladas dentro de un genoma. La MGA hace referencia a los niveles de metilación que se hallan en todas las diferentes secuencias que contienen CpGs, en un momento dado. Existen grandes diferencias entre los niveles de MGA entre tejidos e individuos (Armstroong, 2013), y se sabe que la MGA ha sido importante en la evolución y ecología de animales (Vanyushin et al., 1973). Por ejemplo, los niveles de 5-mC en el pepino de mar y la anémona, difieren del de la lamprea y distintas especies de peces. Por otro lado, existe una marcada diferencia de la MGA entre reptiles, aves y algunos mamíferos. Sin embargo, los niveles de metilación global en peces y anfibios son dos veces más altos (Vanyushin et al., 1973). Cabe mencionar que en los diferentes tejidos de las diferentes clases de animales, también existen diferencias en los niveles de metilación de ADN (Vanyushin et al., 1973). En otro estudio que analizó el contenido de 5-mC en el genoma de 42 vertebrados, se encontró una correlación positiva entre los niveles de metilación y el contenido de CpG. Sin embargo, esta correlación se comporta diferente en peces y anfibios en comparación con reptiles, aves y mamíferos, ya que en éstos últimos hay un contenido menor de CpG. Se cree que esta reducción en dinucleótidos CpG, ocurrió durante la transición al medio terrestre marcada por la aparición de reptiles, y fue acompañada por modificaciones genómicas y cambios importantes en los niveles globales de 5-mC (Jabbari et al., 1997). Es importante destacar, que la tasa de mutación en citosinas metiladas es mayor que en las que carecen de dicha marca (Coulondre et al., 1978). En peces, los NGM se comportan diferente dependiendo de la temperatura que habitan. Las especies polares presentan NGM más altos que las que viven en aguas templadas y en los trópicos. Dentro de este grupo, los peces de la familia Channichthyidae que viven en aguas congeladas tienen los

los niveles más altos de todos. Por el contrario, de entre los que viven en aguas templadas y tropicales, los últimos son los que tienen menores de NGM. Estos resultados han llevado a concluir que hay una correlación negativa entre los NGM y la temperatura corporal (Varriale and Bernardi, 2006a) . En este sentido, los patrones de metilación a lo largo de todo el genoma en diferentes vertebrados han llevado a la misma conclusión: la temperatura tiene una relación directa con la NGM, independientemente de la relación filogenética (Varriale, 2014). En reptiles, los NGM son similares a los de mamíferos y anfibios. Sin embargo, se cree ocurrió una hipometilación en reptiles de manera interdependiente a las otras dos clases (Varriale and Bernardi, 2006b). Recientemente, se observó que la metilación global de ADN participa en un proceso de herencia epigenética transgeneracional en el crustáceo *Artemia*. Al exponer a una generación parental a choques térmicos no letales, se observan cambios en la producción de proteínas de choque térmico (como la Hsp70), mayor tolerancia a choques letales de calor y mayor tolerancia a patógenos, en tres generaciones subsecuentes. Esta respuesta se asocia con alteraciones en los niveles de metilación global, así como en la acetilación de histonas H3 y H4 (Norouzitallab et al., 2014b).

La metilación global del ADN se estudia mayormente en humanos por sus implicaciones a la salud, y algunos estudios a ayudan a comprender la relación de los NGM con la fisiología y el medio ambiente. En un estudio hecho en E.U., se encontró que la MGA (medida en muestras de sangre), no se correlaciona con la edad, el índice de condición corporal, grasa visceral y subcutánea, talla de la cintura, el hábito de fumar o con beber alcohol, pero sí con el género y el origen racial; las mujeres y la gente de color no-hispana presentaron los niveles más bajos(Zhang et al., 2011a). Por otro lado, niveles circulantes de MGA se correlacionan con la glucosa en ayuno, el colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos en gente sana de Newcastle, Reino Unido (Pearce et al., 2012). Los contaminantes orgánicos persistentes (POP), son compuestos xenobióticos que se acumulan en el tejido adiposo, y algunos de éstos como pesticidas organoclorados (OCs), bifenilos policlorados (PCBs) y difenil-esteres polibrominados (PBDEs), tienen un efecto negativo en la metilación global del ADN de células sanguíneas en Koreanos saludables (2010). De igual manera, algunos POP como los pesticidas DDT, DDE, y algunos PCBs, también promueven una hipometilación en la circulación de pobladores Inuit de Groenlandia (Rusiecki et al., 2008). Por otro lado, la exposición a contaminantes gaseosos derivados de la combustión de automóviles (como el NO2, PM10, PM2.5 y O3), también provoca una reducción en la metilación global de ADN en sujetos sanos viviendo en Bélgica (De Prins et al., 2013). Las células espermáticas de ratones expuestos al aire

contaminado cercano a fábricas en un contexto urbano, presentan una hipermetilación de su genoma asociada con un incremento en la tasa de mutación (Yauk et al., 2008).

LA RANA TORO COMO MODELO DE ESTUDIO

De todas las clases de vertebrados en donde se ha estudiado la metilación de ADN en general, y la metilación global, los anfibios son el grupo menos explorado. Las ranas *Xenopus laevis* y *X. tropicalis*, son las dos especies en donde se concentran casi todos los estudios en este sentido, y casi todos éstos se han llevado a cabo en laboratorio. En estas dos especies de rana, se han estudiado las funciones de la metilación del ADN (y otros mecanismos epigenéticos), durante el desarrollo principalmente (ver por ejemplo (Stancheva et al., 2002; Bogdanovic et al., 2011). Sin embargo, ninguno de estos trabajos tiene un enfoque ecológico y/o evolutivo. Esto llama la atención por que al contar con una historia de vida compleja, son un grupo muy atractivo para conocer los efectos del medio ambiente sobre la variabilidad fenotípica y los procesos de especiación. La rana toro (*L. catesbeianus*), es una especie altamente plástica, capaz de vivir y adecuarse a muchos diferentes ambientes. Ha invadido y colonizado casi todos los continentes y se le puede encontrar en cautiverio y en vida libre (Bai et al., 2012). Es originaria del centro y este de E.U., así como del sureste de Canadá (Reynoso, 2009). En México el registro más antiguo de esta rana es del año 1853 en Nuevo León (Kellogg and Kellogg, 1932). Sin embargo, la mayoría de registros ocurrieron a partir de los años 50's (Reynoso, 2009). Habita una gran diversidad de climas y ecosistemas, desde zonas de bosque muy frías en Canadá (Govindarajulu et al., 2006), donde el suelo se congela en buena parte del año, como también en zonas ecuatoriales con condiciones de temperatura y humedad muy elevadas(Boelter and Cechin, 2007). El hecho de que sea una especie muy plástica, la lleva a ser una especie altamente adaptable e invasiva, teniendo en muchos casos efectos negativos en la fauna nativa. El desplazamiento y enfermedades exóticas, son las principales causas. En el caso de especies nativas de anfibios esta situación es muy delicada, ya que es el grupo de vertebrados más amenazado y una de las principales causas del declive poblacional de éstos es la introducción de especies exóticas (AG et al., 2001). Por otro lado, la rana toro exhibe una alta variabilidad fenotípica, aún en condiciones controladas de cautiverio, y seleccionada para su uso comercial (Urieta, J., com. pers.). Es muy importante destacar, que su alta variabilidad fenotípica, no se asocia a un incremento en su diversidad genética. Por el contrario, poblaciones introducidas en China, Francia, Bélgica, Italia, y Reino Unido, presentan una reducción en la diversidad

genética, asociada al efecto fundador de las invasiones biológicas (Ficetola et al., 2006, 2008; Bai et al., 2012). Estos hallazgos indican que existe otro mecanismo distinto a la variación genética que causa la variación del fenotipo de esta rana, viviendo en ambientes diferentes.

PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO

CARACTERIZACIÓN DE LA ESPECIE DE ESTUDIO

La rana toro, *L. catesbaienus* (antes *Rana catesbeiana*), es el anfibio más grande que habita en México y en Norte América. En México, la longitud de su cuerpo, desde el hocico hasta la cloaca puede rebasar los 20 cm y llega a pesar cerca de 500 g (Lemos-Espinal and Smith, 2007). Sin embargo, en poblaciones cercanas a su rango de distribución natural puede alcanzar los 22.5 cm y pesar hasta 850 g (Foundation, 2002). Los individuos en fase larvaria pueden ser "excepcionalmente" grandes, llegando a medir entre 15 y 18 cm. de largo (Antonio and Legorreta). Esta especie de anuro pertenece a la familia Ranidae, que a su vez, pertenece al orden Anura. Junto con las especies *R. clamitans*, *R. heckscheri*, *R. septentrionalis* y *R. virgatipes* conforman el grupo "catesbeiana" (Hillis and Wilcox, 2005). Algunos rasgos que caracterizan a esta rana son la ausencia de líneas dorso-laterales y la presencia de grandes tubérculos en las patas posteriores. Los machos maduros sexualmente, presentan un tímpano muy desarrollado, siendo el diámetro de éste dos veces más grande que el del ojo, mientras que en las hembras se mantiene del mismo tamaño. A pesar de que llega a presentar algunas marcas o motas oscuras de pigmentación en en el área dorsal, es frecuente encontrarla desprovista de patrones muy marcados de coloración como en el resto de las especies del mismo género (Foundation, 2002).

La rana toro es considerada una de las peores especies invasoras del mundo por sus efectos sobre la fauna nativa, y ha colonizado diferentes países por que se puede alimentar de una gran variedad de presas y puede vivir en un diferentes climas y tipos de vegetación (AG et al., 2001). De acuerdo con Bury y Whelan (1985), en la actualidad su rango natural de distribución abarca desde Nueva Escocia en Canadá, hasta el centro de Florida en el sureste de los E.U. y también hasta Texas. Actualmente, este anuro ha sido introducido en 40 países dentro de 4 continentes (Lever, 2003), incluyendo países latinoamericanos como Brasil, Argentina, las Islas del Caribe, Colombia, Ecuador, Uruguay, Perú y Puerto Rico(Bury and Whelan, 1985). En México, la rana toro habita de manera exótica en al menos 20 estados, incluyendo Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Durango, Estado de México, Hidalgo, Jalisco, Michoacán,

Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Reynoso, 2009). Desafortunadamente no existe ningún manejo o control sobre ella y aún no se ha investigado el efecto que la invasión de esta rana puede causar en los ecosistemas del país(AG et al., 2001). Lo que se sabe en otras latitudes, es que la rana toro ocasiona un efecto de desplazamiento de especies nativas (AG et al., 2001) y también se sabe que puede diseminar el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*, que ha diezmado poblaciones de ranas a lo largo de todo el mundo(Mendoza-Almeralla et al., 2015).

LOCALIDADES DE MUESTREO Y COLECTAS

Se trabajó con cinco poblaciones de rana toro pertenecientes a granjas de producción acuícola (Fig. 1). Se muestrearon granjas en tres localidades del estado de Michoacán, éstas son La Purísima (LP), pertenece al municipio de Álvaro Obregón y se encuentra en las coordenadas 19°52’11”N, 101°01’23”O. Isla de Tzirio (TZI) se encuentra en 19°20'11''N, 99°49'79''O, dentro del mismo municipio. Las normales climatológicas para estas dos son: Temperatura máxima: 27.5 °C, Temp. Med.: 18.6 °C y temp mín.: 9.8 °C. La comunidad de Copuyo (COP) que pertenece al municipio de TZItzo se halla en 19°29'50.5"N 100°55'56.1"O, con temperaturas máxima, media y mínima de: 27.53°C, 20.4°C y 13.58°C, respectivamente. En el municipio de Santiago de Querétaro (estado de Querétaro), se trabajó con la granja Aquanimals (COR), con las siguientes coordenadas 20°33'33.7"N 100°27'26.0"O, con temperaturas máxima, media y mínima de: 27.1°C, 18.6°C y 10.2°C. Por último, se visitó una granja en San Pedro Tlaltizapán (SPT), en el municipio de Toluca, Estado de México con las coordenadas 19°12'14.4"N 99°30'02.8"O, en donde las temperaturas máxima, media y mínima alcanzan los 22.5°C, 13.2°C y 3.9°C. Todas las unidades antes mencionadas cuentan con instalaciones semi-rústicas, con un manejo totalmente manual. Todas cuentan con estanques de cemento de aproximadamente 2.5 m^2 de área y se hallan dentro de invernaderos con cubierta de Polietileno (PE) convencional para invernaderos. El control de la temperatura dentro de los invernaderos, no se hace de manera sistematizada, si no de manera manual por las personas encargadas que atienden las indicaciones de termómetros. La comida que se les proporciona diariamente a las ranas es un producto comercial para Trucha arcoiris. En las granjas de Copuyo (Mich.) y Aquanimals (Qro.), se administra la marca Purina (composición garantizada: 40-48% de proteína, 12% grasa, 3% fibra, 14%humedad y 12%

de ceniza)., mientras que en las demás se usa El Pedregal (45% proteina, 16% grasas, 2.5% fibra, 12% humedad y 12% ceniza).

ANIMALES

Las unidades de producción se visitaron en repetidas oportunidades desde el verano de 2013, hasta el verano de 2015. Se trabajó con dos grupos de individuos sexualmente maduros, los primeros de aproximadamente tres años que son reproductores en las unidades acuícolas y ranas de un año que están en proceso de maduración sexual. Éstas aún están en crecimiento y sus caracteres sexuales secundarios no están plenamente desarrollados. Ambos sexos fueron usados para todos los experimentos y toma de medidas a excepción del desafío inmunitario (adelante se detalla). En total, se usaron 10 animales reproductores de cada sexo para cada granja (*n*=10), mientras que para las ranas de un año se usaron 15 (*n*=15) provenientes de las granjas LP y SPT. Debido a que los individuos reproductores son muy importantes para los ranarios sólo pudieron ser manipulados para obtener medidas. Por otro lado, las ranas de un año fueron compradas y se sometieron a las pruebas y procedimientos que abajo se detallan. Es muy importante señalar que inicialmente se trabajó con cinco localidades en los cuatro estados diferentes. Sin embargo, después de un año y medio de haber colectado datos de todas éstas y haber comenzado el análisis de datos, sólo se pudo terminar de trabajar con dos, LP y SPT. Debido a esto, sólo se llevaron los análisis de la morfometría lineal y el cálculo de la condición corporal en adultos para las localidades COP, TZI y COR, mientras que para las dos restantes se llevó a cabo el análisis morfométrico geométrico, toda la caracterización fisiológica, así como la determinación de los niveles globales de metilación de ADN. Por último, es fundamental recalcar que por cuestiones de tiempo, no se pudo concluir el proyecto, ya que sólo se pudieron cubrir tres de los cuatro objetivos planteados originalmente.

FIGURA 1. LOCALIDADES DE MUESTREO DE RANA TORO.

Fotografía satelital de México obtenido con GNOME-Maps, en donde se señalan las cinco localidades en donde se hallan las unidades de producción acuícola. Las tres de abajo y a la izquierda pertenecen a Michoacán, la más superior al estado de Querétaro y la última al estado de México.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD MORFOMÉTRICA DEL FENOTIPO DE RANAS TORO (*L. CATESBEIANUS,* SHAW 1802) VIVIENDO EN CAUTIVERIO EN LOCALIDADES DIFERENTES.

Los factores que pueden afectar la evolución morfológica son muchos y pueden actuar a diferentes niveles, desde la biología molecular, hasta en procesos de ecología de comunidades (Hanken, 1992). Los anuros son uno de los grupos más diversos de tetrápodos, con al rededor de 6,200 especies (Jorgensen and Reilly, 2013). Además, este grupo es uno de los más diversos en cuanto a su morfología y más derivado de entre los vertebrados. A pesar de que el plan corporal de los anuros está muy bien conservado en todo el orden, varía de manera importante con respecto a su esqueleto. Su modo de vida bifásico entre el estadio larvario y el adulto también genera diferencias morfológicas importantes (Handrigan and Wassersug, 2007). A la fecha, se han llevado a cabo muchos estudios para comprender los procesos que generan variabilidad en su morfología y han ayudado a comprender la historia evolutiva de este grupo (Handrigan and Wassersug, 2007). En la familia Ranidae, los trabajos publicados cubren aspectos geográficos, fisiológicos, ontogenéticos, filogenéticos, de historia de vida, entre otros (Collins, 1979; Laurila et al., 2002; Larson, 2005; Steyermark et al., 2005; Cook et al., 2013). Aunque para *L. catesbeianus* no existe mucha literatura al respecto, se sabe que diferentes condiciones ambientales como la duración del día, la cantidad de precipitación o nieve, el patrón anual de lluvias, las temperaturas mínimas en invierno, así como las máximas en verano, pueden tener un efecto en la morfología, y en rasgos de historia de vida (Govindarajulu et al., 2006). Por ejemplo, poblaciones de *L. catesbeianus* viviendo a diferentes altitudes, y en en distintos climas, (templado vs cálido), pueden diferir en su talla, la longitud corporal a la madurez sexual y en cuanto a su dimorfismo sexual (Xuan et al., 2009). Cuando son expuestas a diferentes hidroperiodos, las larvas de esta rana crecen a una tasa diferente (Cook et al., 2013). Ranas toro viviendo en climas menos fríos y templados, como en Columbia británica a diferencia de Ontario, Canadá, presentan diferencias en la talla de metamorfos e individuos adultos, así como también en la tasa de crecimiento(Govindarajulu et al., 2006).

En el presente estudio, se trabajó con ranas toro que viven en cautiverio, dentro de invernaderos enfocados a la producción de carne. A diferencia de las condiciones

climáticas a las que se expone la rana toro en vida libre, las variables ambientales a las que son expuestas en cautiverio son muy controladas y poco diversas. Por ejemplo, todas comen casi la misma dieta, el nivel de agua y la densidad poblacional es muy similar, y no hay presencia de predadores. Sin embargo, creemos que las condiciones microclimáticas dentro de los invernaderos, son influenciadas por el clima externo de cada localidad, y son suficientes para provocar variaciones fenotípicas entre poblaciones (ver normales climatológicas para las localidades en Planteamiento metodológico) En este sentido, son bien conocidas las diferencias fenotípicas entre ranas de distintas unidades de producción en Michoacán (Urieta com.pers.) En el presente capítulo, se presenta la metodología, los resultados y la discusión en torno al objetivo de analizar la variabilidad morfométrica del fenotipo de ranas toro (*L. catesbeianus*) viviendo en localidades diferentes. La manera más conveniente de abordar este objetivo fue mediante análisis multivariado de la morfometría lineal corporal y geométrica del cráneo. Es importante señalar que inicialmente se trabajó con cinco localidades en cuatro estados diferentes. Sin embargo, después de un año y medio de haber colectado datos de todas éstas y haber comenzado el análisis de datos, sólo se pudo terminar de trabajar con dos: LP (Michoacán) y SPT (Edo. De Mex.). Debido a esto, el análisis de la morfometría en individuos juveniles sólo se hizo para éstas últimas.

METODOLOGÍA

MORFOMETRÍA LINEAL

Se usó un análisis morfométrico multivariado para poder comparar no sólo un rasgo corporal, si no para conocer el comportamiento global o completo de la morfometría para cada individuo en cada granja. Además de tomar el peso de cada individuo (g), se obtuvieron siete medidas lineales con ayuda de un vernier (margen de error 0.01 cm), las cuales fueron Longitud Ocico-Cloaca (LNC), ancho de cabeza (ACA), largo de cabeza (LCA), diámetro de tímpano (DT, tomado perpendicularmente a la maxila), diámetro de ojo (DT) (medido a través de su eje más largo), largo de ancas (fémur más tibia y fíbula) y largo de pié. Los animales que se usaron pertenecieron a dos grupos de edades. Por un lado, se usaron ranas sexualmente maduras de tres años de edad, de ambos sexos en las cinco localidades descritas (n=100). Por otro lado, se usaron ranas de ambos sexos y sexualmente inmaduras de un año de vida, de las granjas LP y SPT (n=60).

Con los datos obtenidos se hicieron dos tipos de análisis multivariados. Primero un análisis de componentes principales (PCA), y otro canónico discriminante (CVA), detallados más adelante en “Estadística”.

MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA

Para establecer una caracterización morfométrica precisa y detallada, es importante tomar en cuenta la geometría de caracteres importantes para cada especie y/o población además de contar con medidas lineales. Este tipo de análisis ha permitido estudiar procesos de especiación y morfotipos distintos de una misma especie en anfibios y otros vertebrados(Vieira et al., 2008). En el grupo de los anfibios, se ha propuesto que el esqueleto y especialmente el cráneo, además de ser una estructura muy compleja, provee mucha información desde un punto de vista evolutivo(Larson, 2005). De manera breve, se obtuvieron cráneos de ranas de las localidades LP y SPT, los cuales fueron limpiados a mano con equipo de disección. Cuando fue pertinente se trataron los cráneos con agua caliente para un mejor manejo. Posteriormente, se tomaron fotos ventrales de los cráneos incluyendo siempre una regla para obtener la escala y una tarjeta de identificación. Utilizando los programas TpsUtil y Tps2 (James Rohlf, Stony Brook University (Rohlf, 2015), se sobrepusieron para cada foto diez puntos de referencia o “landmarks”. La selección de los puntos de referencia (Fig. 2), se hizo tomando en cuenta algunos que fueron usados en dos artículos recientemente publicados (Larson, 2002, 2005). La posición de cada punto de referencia se detalla a continuación, 1) límite dorsal y medial del hueso paraesfenoide, 2) punto medio del vómero a la altura del proceso palatino, 3) punto extremo posterior de la premaxila, 4) extremo anterior de la premaxila en el límite del cráneo, 5) extremo dorsal-lateral del paraesfenoideo, 6) unión del paraesfenoideo con el pterigoide, 7) unión posterior de la premaxila con maxila, 8) extremo posterior del pterigoide donde se une con el cuadratojugal, 9) punto de convergencia entre el pterigoide y la maxila, 10) unión del proceso palatino con la maxila. Con estos puntos de referencia se construyó una matriz de datos para su análisis estadístico y geométrico. Para este fin, se usó un software especial, MorphoJ 2.0 (Klingenberg C.P., Universidad de Manchester (Klingenberg, 2011)). Primero, se hizo una alineación de los landmarks de todos los especímenes, usando el método ortogonal generalizado de mínimos cuadrados Procrustes, para generar una configuración consenso. Con el resultado de la alineación, se obtuvieron las coordenadas Procrustes y el tamaño del centroide para cada individuo. Con esta información, se construyó una matriz de covarianza con la que se llevó a cabo un análisis Canónico

Discriminante (CVA). Este tipo de análisis maximiza las diferencias entre grupos predefinidos y se ha usado en estudios comparativos entre especies de la misma familia que *L. catesbeianus* (Larson, 2005).

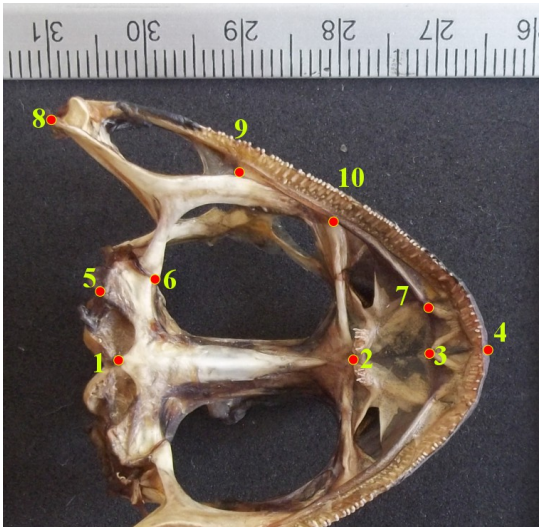

FIGURA 2. LOCALIZACIÓN DE LOS PUNTOS DE REFERENCIA PARA LA MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA.

Foto ventral del cráneo de una rana de un año de edad, después de haber sido limpiado. Diez puntos de referencia se usaron para el análisis morfométrico geométrico en las siguientes estructuras: 1) límite dorsal y medial del hueso paraesfenoide, 2) punto medio del vómero a la altura del proceso palatino, 3) punto extremo posterior de la premaxila, 4) extremo anterior de la premaxila en el límite del cráneo, 5) extremo dorsal-lateral del paraesfenoideo, 6) unión del paraesfenoideo con el pterigoide, 7) unión posterior de la premaxila con maxila, 8) extremo posterior del pterigoide donde se une con el cuadratojugal, 9) punto de convergencia entre el pterigoide y la maxila, 10) unión del proceso palatino con la maxila.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y SOFTWARE

Se utilizó una aproximación multivariable para el análisis de la morfometría, tanto lineal como geométrica. Ello con el fin de integrar y resumir toda la variación del conjunto de los rasgos morfológicos, y así poder comparar la variabilidad fenotípica entre las diferentes localidades y sexos. Para el análisis PCA, se construyó una matriz de correlación con todas las variables lineales, y así se obtuvieron los valores eigen para cada individuo

muestreado y también los vectores eigen, para conocer los efectos de cada variable fenotípica en la variabilidad total. El análisis CVA es muy similar al PCA, sólo que se basa en la construcción de una matriz de covarianza para maximizar las diferencias entre grupos de observaciones; que en este caso corresponden a las diferentes localidades y sexos. Para la morfometría lineal, la matriz de covarianza se construyó con las mediciones lineales corporales, mientras que para la geométrica se construyó con las coordenadas Procrustes. Para saber si existen diferencias entre localidades y sexos, se llevó a cabo una prueba Lambda de Wilks sobre el análisis multivariado ($p<0.05$). En el caso de la morfometría geométrica, se calculó la distancia de Mahalanobis para saber si hay diferencias significativas entre ranas de las diferentes localidades. ($p<0.05$).

RESULTADOS

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO LINEAL

En hembras reproductoras, la variación en la morfometría lineal (Fig. 3A), fue afectada principalmente por ACab y LCab, aportando cada variable 18.53% y 18.14% del PC1. El tímpano (28.95) y el ojo (44.21%) contribuyeron mayormente al PC2. En el caso de machos adultos (Fig. 3B), el PC1 se compuso en un 18.89% de LNC y 18.86% de Acab, mientras que el PC2 estuvo compuesto predominantemente de la variación del ojo (42.28%) y ancas (35.02%). Considerando ambos sexos, el efecto de la localidad sobre la variabilidad fenotípica fue significativa (Hembras: $\lambda = 0.04$, $F = 5.89$, $p<0.001$; Machos: $\lambda = 0.06$, $F = 4.8$, $p<0.001$), y también se encontró una diferencia significativa al comparar ambos sexos ($\lambda = 0.11$, $F = 86.98$, $p<0.001$).

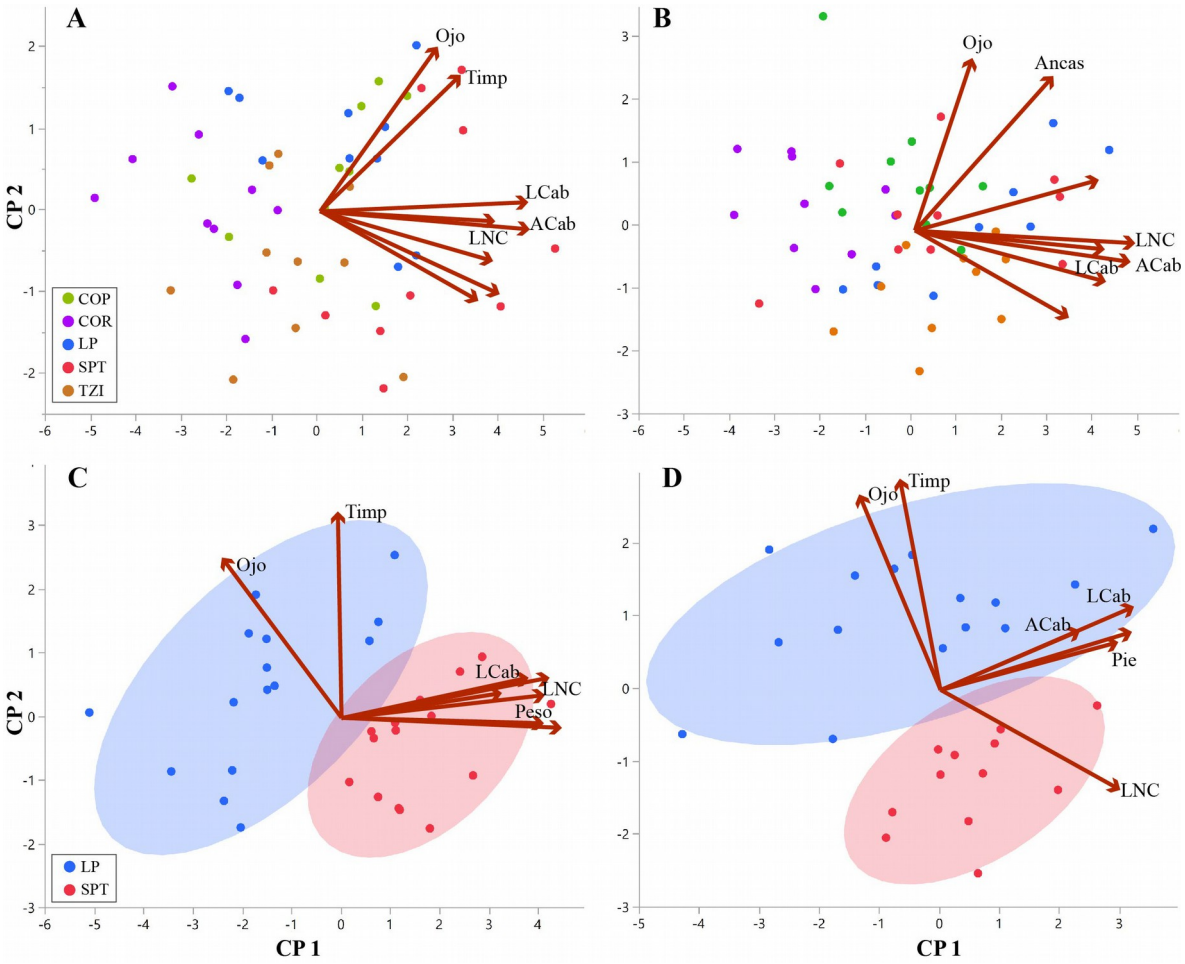

FIGURA 3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LA MORFOMETRÍA LINEAL EN RANAS TORO.

Análisis de la morfometría lineal en ranas reproductoras hembra (A, n=50), reproductores macho (B, n=50), hembras juveniles (C, n=30) y machos juveniles (D, n=30). Se graficaron los componentes principales 1 y 2 (CP1 Y CP2). Los puntos representan cada animal muestreado, ajustado a dichos componentes. Las flechas rojas representan los vectores Eigen para cada variable lineal, y se nombran las que más contribuyeron al análisis global. Las elipses en las figuras C y D, representan el intervalo de confianza de 95%, para la dispersión de los datos. Las elipses no se muestran en A y B para una mejor apreciación de la figura.

La variabilidad en la morfometría lineal en hembras juveniles (Fig. 3C), se vio principalmente influenciada por la LNC, LCab y Ancas, aportando el 19.44%, 16.7%, y 17.29%, respectivamente, del componente principal 1 (PC1). El PC2 estuvo fuertemente influenciado por el diámetro del tímpano (59%) y del ojo (34.97%). En el caso de los machos juveniles (Fig. 3D), el PC1 también se ve afectado mayormente por la LNC, LCab y Ancas, aportando 18.9%, 15.56%, y 14.47%, respectivamente. Las variables del Timp y Ojo también fueron las que más variabilidad aportaron al PC2, con 35.92% y 28.29%, respectivamente. Por otro lado, la variación morfométrica en ranas juveniles de LP y SPT, fue significativamente diferente entre las dos localidades, tanto para hembras ($\lambda = 0.15$, $F = 14.19$, $p<0.001$) como para machos juveniles ($\lambda = 0.12$, $F = 15.66$, $p<0.001$). Así mismo, tomando en cuenta ambas localidades, también se encontraron diferencias significativas entre ambos sexos ($\lambda = 0.13$, $F = 39.00$, $p<0.001$).

MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA

En concordancia con los resultados obtenidos para la morfometría lineal en individuos juveniles, la geometría del cráneo se vio influenciada por la localidad y por el sexo en su conjunto (Fig. 4). La distancia de Mahalanobis entre cada grupo de datos fue significativa ($p<0.001$). En LP, la geometría del cráneo en ranas macho fue distinta de las hembras ($p<0.001$), mientras que en SPT fueron similares ($p=0.1$). Comparando hembras entre las dos localidades, la geometría no es significativamente distinta ($p=0.1$), y en el caso de los machos sí lo fue ($p<0.001$). Por otro lado, los puntos de referencia que mayormente contribuyeron en la variación de este carácter complejo fueron el 1, 5 y 8, ubicados en la zona posterior del cráneo (para referencia ver Fig. 2).

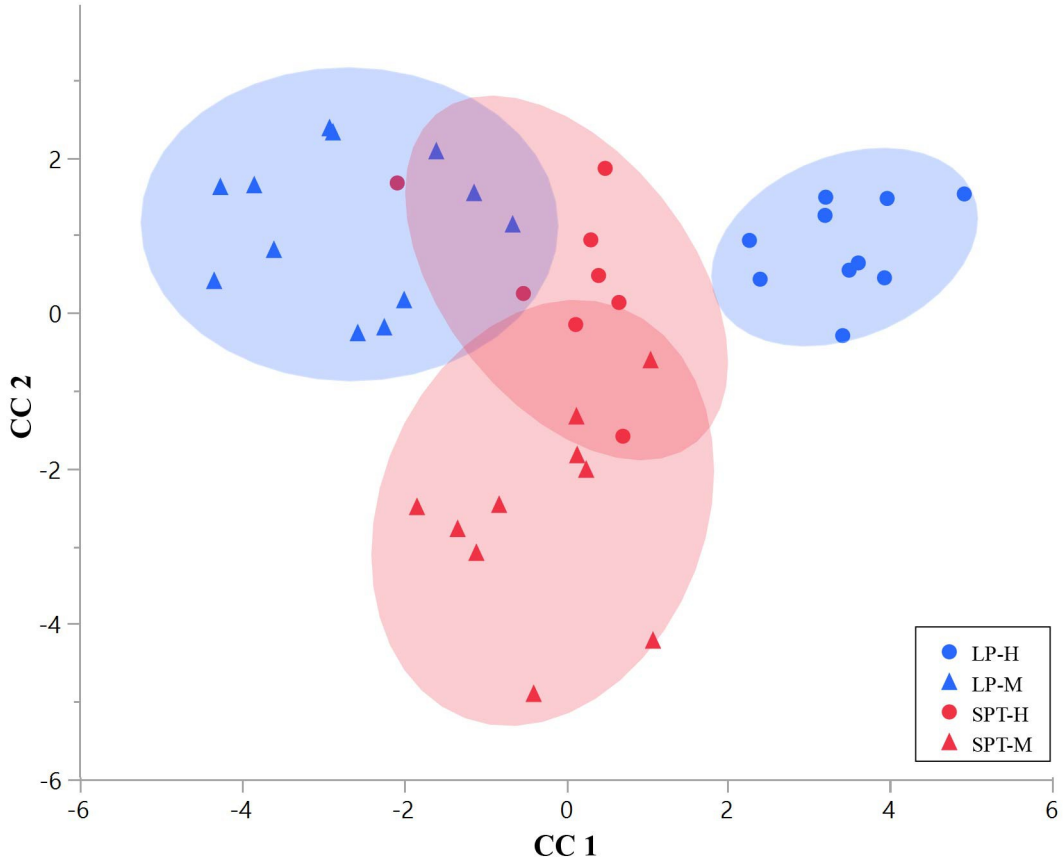

FIGURA 4. ANÁLISIS CANÓNICO DISCRIMINANTE DE LA MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL CRÁNEO DE RANAS TORO.

El análisis de componentes canónicos (ACC) se hizo sólo en ranas juveniles, hembra de la localidad LP (círculos azules, n=10), machos de LP (triángulos azules, n=13), hembras de SPT (n=8) y machos de SPT (n=10). Se muestran los valores de las variables canónicas 1 y 2 para cada individuo, calculados con las coordenadas Procrustes derivadas de los 10 puntos de referencia que se ubicaron en fotografías de la parte ventral del cráneo de ranas de un año de edad. Las elipses corresponden a los intervalos de confianza del 95%, para la dispersión de los datos.

DISCUSIÓN

El análisis morfométrico presentado, mostró que existe variación fenotípica intraespecífica en la Rana toro. Esta variabilidad es discreta, sobre todo en animales reproductores de tres años. La variabilidad se comporta de manera distinta en hembras y machos reproductores y en juveniles. Si bien, en los grupos de animales reproductores la variación es discreta, se puede decir con certeza que la localidad tiene un efecto importante en generar esta variación fenotípica. De manera similar, en un estudio hecho por Silva y cols (2008), se encontró que la rana *Eupemphix nattereri* también presenta una alta divergencia morfométrica intraespecífica. Al analizar la similitud genética y la morfometría con 11 variables en esta rana, no hubo una correlación entre la distancia genética y la morfométrica, lo cual indica que la distancia geográfica entre poblaciones tiene un efecto marcado sobre la morfometría y la forma corporal (Diniz-filho, 2008). En otro estudio, se analizó la relación del clima y la geografía con la variación fenotípica en diferentes poblaciones de una rana europea (*Hyla intermedia*). La morfometría general de esta rana está correlacionada tanto con la distancia geográfica, como con el clima. Por un lado, la forma del cuerpo sólo se asoció con la geografía, mientras que el tamaño corporal y la estructura demográfica sólo lo hicieron con el clima. La variable que más explicó la variabilidad morfométrica en su conjunto fue el tamaño corporal, y ésta variable tuvo una alta correlación con el clima y la distancia geográfica (Rosso and Castellano, 2004). Esto resulta interesante ya que en el presente análisis, la longitud corporal también fue la que mayormente explicó la variación morfométrica en ranas hembras y macho adultas. En anfibios, este caracter cuantitativo depende de rasgos de historia de vida, como el tiempo y tamaño a la metamorfosis, la tasa de crecimiento antes y después de la madurez sexual, la edad a la madurez y la longevidad. A su vez, factores genéticos, y ambientales actúan sobre la historia de vida, amplificando o atenuando la variación en el tamaño corporal (Rosso and Castellano, 2004). En la provincia de Yunnan, China, se llevó a cabo un estudio para conocer el tamaño corporal y el dimorfismo del tamaño sexual en ranas toro introducidas en dos sitios con diferente altura. En el sitio con menor altitud se hallaron las ranas con mayor tamaño, y las ranas hembra en ambos sitios tienen un mayor tamaño corporal que los machos. Por otro lado, el dimorfismo sexual en el tamaño fue mayor en las ranas más grandes, provenientes del sitio con menor altitud (Xuan et al., 2009). En este sentido, es muy posible que las condiciones microclimáticas dentro de cada invernadero de producción, hayan afectado tanto el tamaño corporal, como la variación morfométrica

total. El hecho de que dichas condiciones microclimáticas no sean tan cambiantes como en vida libre, probablemente provoca que la variación no sea tan alta.

De acuerdo con Bury y Whelam (Bury and Whelan, 1985), la ubicación geográfica influencia fuertemente el tamaño corporal y el tamaño a la madurez reproductiva. En una especie invasiva como la rana toro, esto es muy importante ya que viviendo fuera de su rango de distribución nativa, como en el caso de Brasil, ésta puede presentar un ciclo de reproducción continuo (Boelter and Cechin, 2007). Al evaluar con más detalle los datos morfométricos encontramos que para el tamaño corporal (LNC), la localidad y el sexo tienen un efecto dependiendo de la edad. En ranas juveniles, sólo la localidad tiene un efecto en el tamaño corporal (Localidad: $F=28.61$, $p< 0.001$; sexo $F=0.43$, $p=0.51$, loc*sexo $F=0.11$, $p= 0.73$). En cambio, en las ranas adultas de tres años, el sexo y la interacción entre sexo y localidad explican la variación en LNC (Localidad: $F=1.96$, $p=0.16$; sexo $F=5.20$, $p=0.02$, loc*sexo $F=12.45$, $p= 0.001$). Este resultado sugiere que a pesar de que al año de edad, las ranas toro ya pueden reproducirse, aún no presentan dimorfismo en tamaño sexual. Y es hasta los tres años (probablemente antes, aunque no se hicieron experimentos al respecto), que alcanzan una talla correlacionada a su madurez sexual. En el estudio mencionado anteriormente, también se encontró que las ranas toro pueden alcanzar su madurez sexual a partir de los 9 cm (Boelter and Cechin, 2007). En Brasil, ranas toro en condiciones de invernadero, la talla en la que comienzan su madurez sexual, es 8.09 cm y 10.33 cm, para machos y hembras, respectivamente(Lima et al., 1998). En el presente análisis las ranas más chicas miden aproximadamente 12 cm, entonces, sería muy interesante saber si en condiciones en cautiverio, la rana toro puede alcanzar su madurez con tallas aún más chicas.

En el análisis morfométrico lineal, se encontró que el largo del cuerpo y casi todas las medidas de la cabeza fueron las que más contribuyeron a la discriminación estadística entre las localidades. En el caso de hembras adultas LCA y ACA fueron las variables más importantes, para los machos fue LNC y ACA, mientras que para individuos juveniles fueron el LNC y LCA. En un estudio Taiwanés, que analizó la divergencia morfológica entre poblaciones aisladas geográficamente de *Rana sauteri*, se encontraron resultados similares. Las ranas macho expresan mayor variabilidad en la distancia narina-tímpano (DNT), en la longitud de la cabeza al brazo, y en la longitud de la cabeza, mientras que en hembras son DNT, LNC y el largo del pie (Wen-Hao Chou and Jun-Yi and Lin). Por su lado,

Silva y cols ((Diniz-filho, 2008)), encontraron que la LNC, LCA y ACA, fueron las tres variables que presentaron diferencias significativas entre nueve poblaciones de *Eupemphix nattereri* (Ranidae) en el centro de Brasil. En otro estudio, se evaluaron los mecanismos de aislamiento reproductivo de la rana *Fejervarya limnocharisuna* , perteneciente a la misma familia que la rana toro. En éste, las variables morfométricas de los miembros anteriores y posteriores fueron predominantes en ambos sexos. Sin embargo, los caracteres que describen cabeza como LCA y ACA también contribuyeron de manera significativa a la variación fenotípica(Djong et al., 2007). Todos estos estudios antes mencionados, apoyan los hallazgos obtenidos. Esto sugiere que las ranas toro viviendo en cautiverio, presentan variabilidad en los mismos rasgos fenotípicos que otras ranas de la misma familia, viviendo en poblaciones naturales. Esta observación también apoya el uso de sistemas controlados de producción acuícola como una estrategia experimental para contestar preguntas ecológicas y evolutivas.

En el caso de juveniles, las medidas del ojo, tímpano y largo de cabeza tuvieron un efecto predominante en toda la morfometría y no la LNC. Esto puede indicar que en la etapa de crecimiento para alcanzar la madurez sexual, los rasgos de la cabeza cambian más que todo el cuerpo. Es bien sabido que el tímpano en ranas toro macho es más grande que el ojo, lo que no ocurre en hembras (Foundation, 2002). Sin embargo, esta diferencia en el tamaño del tímpano ocurre durante el proceso de maduración reproductiva. Por ejemplo, el DT en ranas macho adultas de tres años es significativamente mayor que el de juveniles ($t = 24.2924$, $p< 0.001$), mientras que el DO es igual para ambos grupos ($t = -0.1006$, $p= 0.92$). De manera similar, Lima y cols. (1998), encontraron que ranas toro criadas en invernaderos, presentan un diámetro del tímpano de acuerdo con su etapa de madurez sexual. Las ranas macho en la última etapa de madurez (correspondiente a una LNC de más de 14 cm), tienen un tímpano significativamente más grande que el de hembras de esa misma etapa y que el de machos más jóvenes. En el mismo estudio, se observa que aún cuando el tímpano no está completamente desarrollado en ranas macho, la maduración gonadal ya ha comenzado(Lima et al., 1998), lo que concuerda con lo que se observa en SPT y LP.

La morfometría geométrica ha probado ser una excelente herramienta para describir procesos de ontogenia, interacciones ecológicas con el desarrollo y para estudios evolutivos. En la familia Ranidae, la forma del cráneo, la ontogenia y la historia evolutiva

(filogenia) están fuertemente relacionadas (Larson, 2005). En este contexto es importante analizar la Figura 5. Se puede observar que hay diferencias en la geometría del cráneo entre las dos localidades, considerando cada sexo por separado. Por otro lado, considerando a cada localidad por separado, el comportamiento entre sexos es diferente. En la localidad de SPT las ranas macho no son distintas a las ranas hembra, mientras que en la LP sí lo son. Este resultado inesperado sugiere que en ranas de un año, el dimorfismo sexual se comporta de manera distinta dependiendo de la localidad. Hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer reporte de variaciones morfo-geométricas en el dimorfismo sexual en la rana toro. En dos especies de roedores ocurre algo similar, en cuanto a que el dimorfismo sexual en la forma del cráneo y otras estructuras varía geográficamente (Abdel-Rahman et al., 2009). Por otro lado, poblaciones de dos diferentes especies de anfibios en China y Australia también varían en el dimorfismo sexual de la talla, y esto se asocia con las variaciones ambientales asociadas a su distribución geográfica (Sch, 2004; Xuan et al., 2009). Una vez más, el factor a tomar en consideración al interpretar estos resultados, junto con los que se muestran el la Fig. 5, es que los animales usados se reproducen y desarrollan en cautiverio. Las localidades muestreadas para este análisis se encuentran geográficamente alejadas pero no se han hecho mediciones microambientales para saber qué factores son diferentes. Sin embargo, existe una posibilidad de que las diferencias en el dimorfismo que fueron encontradas se deban a procesos ontogenéticos. Un hallazgo que puede apoyar esta posibilidad, es que en ranas post-metamórficas los cambios en la forma del cráneo se explican por las etapas en el desarrollo de los animales y no al crecimiento general (alometría)(Garriga and Llorente, 2012; Ponssa and Candioti, 2012). Para poder probar este efecto, se necesitará llevar a cabo el análisis a lo largo de la ontogenia de la rana toro en distintas localidades.

Recientemente, se llevó a cabo un estudio para determinar la relación entre la diversidad genética y la diversidad morfométrica en poblaciones introducidas del gorrión común (*P. domesticus*). Esta especie invasiva mantiene casi la misma diversidad genética en Brasil que en Europa, y las diferencias en cuanto a la morfometría entre diferentes poblaciones es alta(Lima et al., 2012). En el caso de poblaciones introducidas en EU, lo que se observa es una reducción de la diversidad genética, y junto con ella cambios en la metilación del ADN (Schrey et al., 2012). Estos hallazgos, indican que tanto la diversidad genética, como la epigenética, aumentan la diversidad fenotípica que ayuda a esta especie a colonizar nuevos ambientes. Siguiendo esta línea, entonces es plausible creer que la variabilidad morfométrica en la rana toro, puede ser provocada en parte, por variaciones en la metilación del ADN.

CONCLUSIONES

La rana toro expresa una alta variabilidad morfométrica, tanto lineal como geométrica. La variabilidad es influenciada por el efecto de la localidad de muestreo, así como por el sexo de los individuos, y la interacción de éstas variables. Los resultados obtenidos con la rana toro, concuerdan con la alta plasticidad fenotípica que caracteriza a esta especie invasiva y demuestran que aún en condiciones de cautiverio, esta especie invasiva es capaz de expresar variabilidad fenotípica intraespecífica. Estos hallazgos apoyan el uso de este tipo de especies para contestar preguntas fundamentales en la ecología y biología evolutiva.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD FENOTÍPICA EN LA FISIOLOGÍA DE RANAS TORO (*L. CATESBEIANUS*) VIVIENDO EN CINCO LOCALIDADES DIFERENTES.

Los rasgos fisiológicos son vitales en la historia evolutiva de vertebrados y todos los animales. En la actualidad, se estudia mucho el efecto del medio ambiente sobre las ranas porque sus poblaciones están declinando a un ritmo alarmante en todo el mundo. Factores como el calentamiento global, la contaminación ambiental y la dispersión de enfermedades como el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, están detrás de éste fenómeno (Kiesecker, 2010). Los anuros cuentan con una compleja historia por que tienen dos hábitos de vida muy distintos cuando son larvas y adultos (Emerson, 1986). Además, hay algunos rasgos cruciales que definen su interacción con el medio ambiente, como el hecho de que son ectotermos. La temperatura externa regula todos sus procesos fisiológicos y sólo pueden regular su temperatura interna apartándose de la fuente de calor. También son dependientes del agua, por que al menos todos los anuros (o casi todos), la necesitan para reproducirse. Junto con otros factores, como la densidad o presencia de enfermedades, estos dos factores afectan el crecimiento, el comportamiento, las defensas inmunológicas(Demas and Nelson, 2012), y la reproducción (Easley et al., 1979). En este sentido, la distribución geográfica, que conlleva diferencias climáticas entre poblaciones, es un factor que comúnmente aporta mucha variabilidad en la fisiología de anuros (Sztatecsny and Schabetsberger, 2005). El sexo también es determinante en los rasgos fisiológicos, y es común observar dimorfismo sexual en el tamaño corporal, tasa de crecimiento y tasa metabólica (Yu et al., 2010). Por otro lado, la ontogenia es fundamental para entender las respuestas fisiológicas a diferentes estímulos ambientales, como la temperatura, la alimentación o desecación (Merila et al., 1998; Laurila et al., 2002).

En el caso de la rana toro, los rasgos que se sabe varían más comparando poblaciones nativas e introducidas son el tamaño de la puesta, el tiempo hasta la metamorfosis, el tamaño de los renacuajos, así como de los adultos, la relación peso/talla, y la tasa de crecimiento (Govindarajulu et al., 2006). En este sentido, su alta capacidad reproductiva y gran tamaño corporal, son rasgos fundamentales en el éxito que ésta tiene

al colonizar nuevos hábitats (Boelter and Cechin, 2007; Xuan et al., 2009). También es importante mencionar que la distribución geográfica afecta muchos rasgos de esta especie (Collins, 1979; Boelter and Cechin, 2007; Xuan et al., 2009). Por lo tanto, es de esperar que la rana toro, proveniente de las diferentes localidades muestreadas en el presente estudio, exprese variabilidad en las respuestas fisiológicas a los diferentes factores bióticos y abióticos a los que es expuesta.

En el presente capítulo, se presenta la metodología, los resultados y la discusión en torno al objetivo de caracterizar la variabilidad fisiológica del fenotipo de ranas toro (*L. catesbeianus*) provenientes de localidades diferentes. La manera más conveniente de abordar este objetivo fue mediante la determinación de rasgos ampliamente usados en otros estudios ecológicos, como la condición corporal, el tamaño corporal y la hematología. También se llevó a cabo un desafío inmunitario con el objetivo de tener una variable dinámica y no meramente descriptiva. Es importante señalar que inicialmente se trabajó con cinco localidades en cuatro estados diferentes (ver Planteamiento). Sin embargo, después de un año y medio de haber colectado datos de todas éstas y haber comenzado el análisis de datos, sólo se pudo terminar de trabajar con dos, LP (Michoacán) y SPT (Edo. De Mex.). Debido a esto, el análisis de la hematología sólo se llevó a cabo con éstas dos últimas. Por los mismos motivos, el desafío inmunitario con fitohemaglutinina-P, se pudo llevar a cabo sólo con tres localidades: COR, LP y TZI.

METODOLOGÍA

CONDICIÓN CORPORAL

Existen distintos índices para calcular la condición corporal en vertebrados. Sin embargo, se usó el Índice de Masa Escalar (IME) propuesto por Peig y Green (2009), por que usa un factor de escalamiento de la longitud corporal (bSMA), que se calcula con todos los individuos del propio muestreo. Además, es un buen indicador no invasivo de las reservas relativas de energía con respecto a la talla de distintos vertebrados. Éste ha sido validado con datos de la composición corporal (grasa, masa en seco y agua total) en ardillas, ratones, topos, serpientes (Peig et al., 2009)., y también en anfibios (MacCracken and Stebbings, 2012). De manera breve, para calcular el IME, primero se toman los datos de longitud ocico-cloaca (cm) y peso(g) y se transforman a logaritmo natural (ln). Con los

datos transformados se lleva a cabo una regresión de eje mayor estandarizado (SMA, por sus siglas en inglés), para cada grupo experimental de animales (p.ej. hembras reproductoras, machos reproductores, hembras juveniles LP, etc). El valor de la pendiente de esa regresión, se usa como el coeficiente de escalamiento o "*b*sma". El coeficiente a su vez es usado en la siguiente fórmula para calcular el índice corporal de cada individuo, en donde Mi y Li corresponden a los valores de masa y longitud para cada individuo, respectivamente; y Lo representa la media de la longitud de todos los datos:

$$IME = Mi[\frac{Lo}{Li}]e^{bsma}$$

HEMATOLOGÍA

Para el análisis hematológico, se usaron ranas hembra y macho de un año de edad, de las localidades LP y SPT (n=60). Una vez que fueron sacrificadas por decapitación, inmediatamente se colectó la sangre del tronco en tubos con EDTA como anticoagulante y se conservó a 4°C. Para calcular el porcentaje de células rojas en la sangre (hematocrito) y obtener el plasma, se centrifugaron 2ml de sangre a 4,500 rpm por 15 minutos. Con un vernier se midió el volumen de la sangre total y la porción (%) de eritrocitos en el vial de centrifugación. Para hacer el conteo total de leucocitos se tomaron muestras de sangre y se les añadió reactivo de Turk para teñir las células y fueron contabilizadas en un hematocitómetro. Se llevó a cabo la preparación de frotis de sangre para contabilizar los leucocitos de manera diferencial, para lo cual se tiñeron con solución de Wright por 5 minutos y se contaron 100 células en un microscopio. Por último, se usó una prueba de ANOVA de una vía para evaluar diferencias de estas variables observadas y entre sexo y localidad.

DESAFÍO INMUNITARIO

La inyección de Fitohemaglutinina—P (PHA) en tejido induce respuestas diversas que implican principalmente la activación del sistema inmunológico innato, a través de diversas citocinas que promueven infiltración celular en el tejido y generan un proceso inflamatorio localizado (Sullivan et al., 2000; Vinkler et al., 2010). Esta prueba mide la habilidad de un organismo para montar una respuesta inmunitaria celular, y la ventaja de usarla en estudios ecofisiológicos es que ya ha sido probado en mamíferos, aves, reptiles y

anfibios anuros(Tella et al., 2008; Brown et al., 2011; Brock et al., 2013). Por ejemplo, este reto immunofisiológico fue usado con éxito en ranas de la caña en Brasil(Brown et al., 2011) y en el gorrión común *Passer domesticus (Martin et al., 2003)*. Para esta prueba sólo se pudieron usar siete ranas macho de un año de edad de tres localidades, LP, TZI y COR. A éstas se les inyectó 50 µl de una solución salina-PHA (Roche # cat.:11082132001) con una concentración de 1 mg/ml-1 en el miembro derecho y el mismo volumen de solución salina en el miembro izquierdo como cotrol negativo. Se utilizó un medidor de grosores de precisión Mitutoyo (Mit-7301), para medir la inflamación del espacio interdigital. El diseño de la prueba consistió en medir el grosor del espacio interdigital en ambos miembros antes de la aplicación (0 hrs) y en cinco horarios post-inyección subsecuentes, 3, 6, 12, 24, 36 y hasta las 48 hrs.

Análisis estadístico y software

El análisis de la condición corporal en adultos se hizo en hembras y machos por separado. En el análisis de juveniles, se tomaron ambos; los animales se asignaron a cuatro grupos diferentes dependiendo de la localidad (LP, SPT) y el sexo (H, M). El análisis de la fisiología, en cuanto a condición corporal, tamaño corporal y hematología, y se hizo mediante análisis de varianza (ANOVA) de una y de dos vías cuando las distribuciones de los datos fueron normales. La normalidad de los datos se probó con la prueba de Shapiro-Wilk. Luego, se determinó si las varianzas son homogéneas entre los grupos con una prueba de Bartlett. Para comparar una a una las medias, sobre los ANOVA de una vía, se llevaron a cabo pruebas de Tuckey con un nivel alfa de 0.05. Cuando los supuestos para el ANOVA no se cumplieron, se usó una prueba no-paramétrica de Kruskal-Wallis, con una prueba post-hoc para comparación de muestras Holm-Sidak. También se hicieron pruebas t de student para comparar medias entre dos muestras independientes. Por último, en el caso del desafío inmunitario con fitohemaglutinina-P, se utilizó un modelo generalizado lineal para evaluar el efecto de tres variables, tiempo, localidad y sexo, sobre la respuesta inflamatoria. En dicho caso, se utilizó la función de liga “identity” de la familia gaussiana para distribuciones normales. Se utilizó el programa R 3.1.1 para todos los procedimientos antes citados.

RESULTADOS

ANÁLISIS DE LA CONDICIÓN CORPORAL

En la Tabla 1 se presenta el resumen de la condición corporal para los dos grupos de edad que se estudiaron. En la Fig. 5, se muestra que la condición corporal de ranas hembra adultas, mostró variaciones que resultaron en diferencias significativas entre localidades (AOV, $F=25.31$, $p<0.001$). Las localidades que fueron similares entre ellas y diferentes del resto fueron COR, COP y LP (Tuckey $p<0.001$). De manera similar, en el caso de las ranas macho, la variación entre las diferentes localidades volvió a ser significativa (AOV, $F=23.65$, $p<0.001$), y un tanto menor que en ranas hembra. Al comparar uno a uno los grupos de datos, se encontró que en COP, COR Y LP, las ranas tienen una condición corporal significativamente menor que en las dos restantes (Tuckey, $p<0.001$).

Por su lado, la condición corporal en individuos juveniles también varió significativamente (Fig. 6). La localidad, tuvo un efecto significativo sobre ésta (AOV-II, $F= 54.7192$, $p<0.001$), mientras que el sexo no lo tuvo (AOV-II, $F=1.2006$, $p<0.2782$). Tanto las ranas hembra como macho de LP, tuvieron una condición menor que las de SPT.

	Peso			**LNC**			**IME**			
	Prom.	*Loc.*	*Sexo*	*Prom.*	*Loc.*	*Sexo*	*Prom.*	*bSMA*	*Loc.*	*Sexo*
Juveniles	296.92 ± 6.03	**<0.001**	0.284	12.65 ± 0.6	**<0.001**	0.509	304.5 ± 4.3	3.12 [2.6-3.6]	0.279	0.172
Hembras	303 ± 8.31			12.72 ± 0.11			310.4 ± 5.8	1.93 [1.2-2.6]		
Machos	290.18 ± 8.76			12.59 ± 0.12			298.1 ± 6.1	3.25 [2.6-3.8]		
Adultas	437 ± 10.6	**<0.001**	**0.009**	14.26 ± 0.12	**<0.001**	0.428	446.5 ± 10.1	3.03 [2.5-3.5]	**<0.001**	**0.026**
Hembras	453.44 ± 14.8			14.34 ± 0.17			466.2 ± 14	2.46 [1.8-3]		
Machos	421.25 ± 14.8			14.19 ± 0.17			426.8 ±14	3.88 [3.1-4.6]		

TABLA 1. ANÁLISIS DE CONDICIÓN CORPORAL Y TAMAÑO.

Se presenta el promedio ± el error estándar del peso, LNC e IME (se incluye el índice corporal "bSMA", que corresponde al coeficiente de escalamiento para el cálculo del IME), de ranas juveniles y adultas de ambos sexos. También se presenta la probabilidad de los efectos de las variables localidad y sexo sobre cada variable. Los valores significativos se hallan escritos con letra negrita.

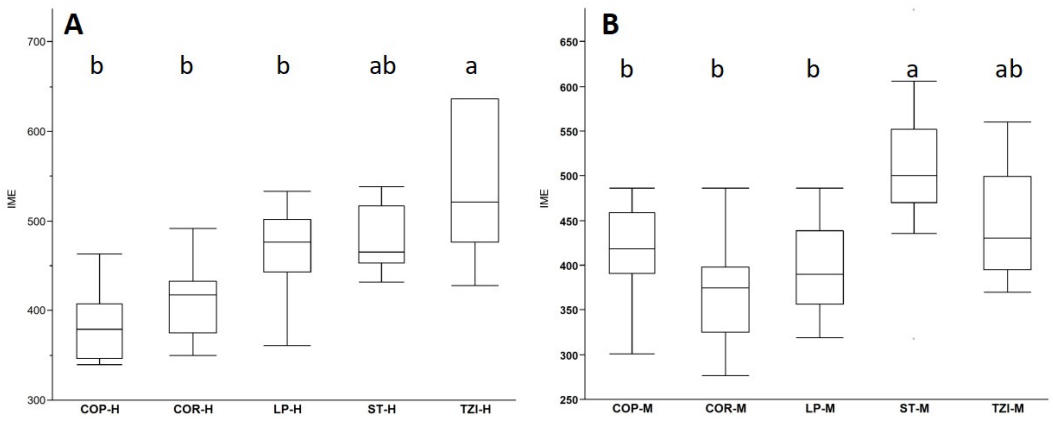

FIGURA 5. CONDICIÓN CORPORAL DE HEMBRAS Y MACHOS ADULTAS.

Cálculo de la condición corporal mediante el métido de Índice de Masa escalar (IME) en ranas hembra (A) y ranas macho (B) de tres años de edad. Las ranas fueron obtenidas en cinco localidades diferentes. Se presentan la mediana, cuartiles y rangos intercuartilares. Las letras representan el análisis post-hoc de Tuckey, sobre el ANOVA de una vía p <0.05 (n=10).

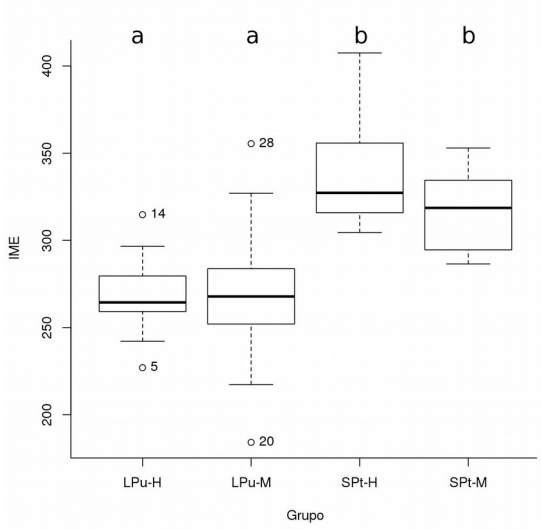

FIGURA 6. CONDICIÓN CORPORAL DE RANAS JUVENILES**.**

Cálculo de la condición corporal mediante el métido de Índice de Masa escalar (IME) en ranas juveniles hembra y macho de un año de edad. Las ranas fueron obtenidas en las localidades LP y SPT. Se presentan la mediana, cuartiles y rangos intercuartilares. Las letras representan el análisis post-hoc de Tuckey, sobre el ANOVA de una vía p <0.05 (n=15).

El tamaño corporal en las localidades de LP y SPT se comportó de manera diferente tomando en cuenta la edad de los individuos (Fig. 7). En el caso de los reproductores, si bien hay un efecto de la localidad y el sexo de cada grupo de datos en la varianza total (Localidad: F=1.96, p=0.16; sexo F=5.20, p=0.02, loc*sexo F=12.45, p= 0.001), éstos no son estadísticamente diferentes (Tuckey=0.05). Sólo se observa una tendencia de las hembras de SPT, a tener un tamaño corporal mayor, generando que haya dimorfismo sexual sólo

en dicha localidad. Por otro lado, la LNC en juveniles de un año de edad sólo la localidad tiene un efecto en el tamaño corporal (Localidad: F=28.61, p< 0.001; sexo F=0.43, p=0.51, loc*sexo F=0.11, p= 0.73). Por último, al hacer una regresión lineal con los datos de peso y LNC, se observa que la relación de estas variables cambia con la edad (Fig. 8). El coeficiente de determinación y la pendiente de la regresión son mayores para juveniles (b=58.59, r^2 =0.65, p<0.001) que para reproductores (b=51.92, r^2 =0.44, p<0.001).

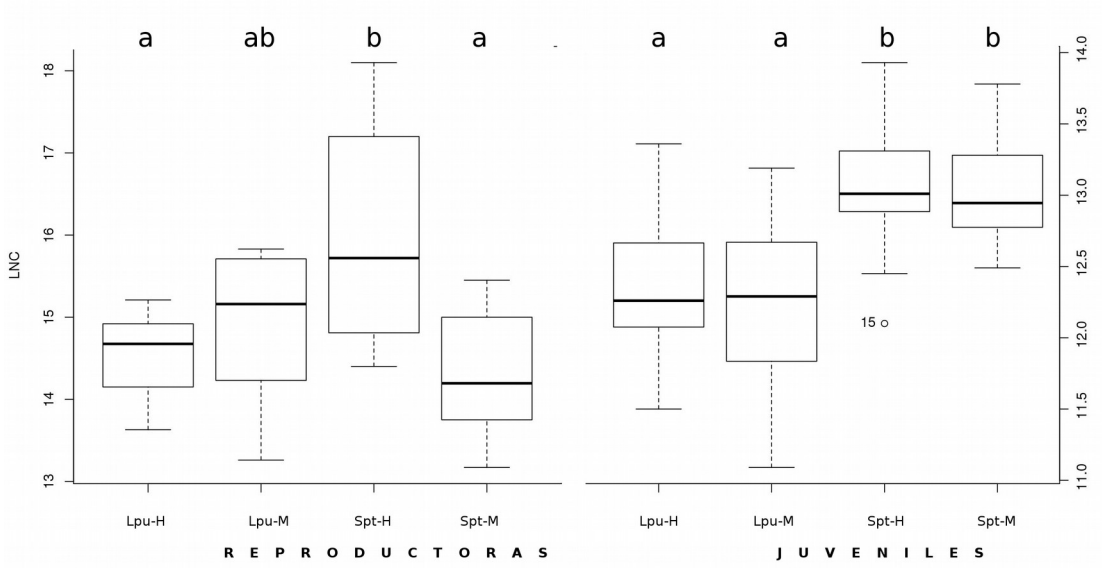

FIGURA 7. TAMAÑO CORPORAL DE RANAS TORO DE LP Y SPT.

Se muestra la longitud total ocico cloaca (LNC) de ranas reproductoras de tres años de edad (izquierda), y juveniles de un año de edad (derecha), provenientes de las localidades LP y SPT. Se presentan la mediana, cuartiles y rangos intercuartilares. Las letras representan el análisis post-hoc de Tuckey, sobre el ANOVA de una vía *p* <0.05 (*n*=10 y 15, respectivamente).

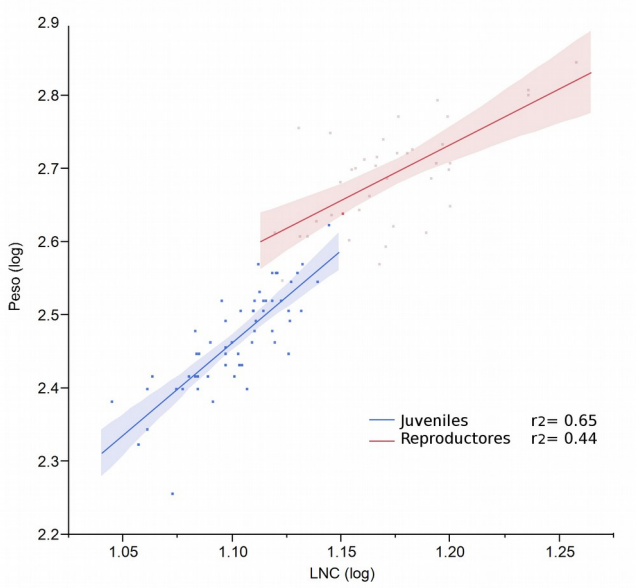

FIGURA 8. RELACIÓN DEL PESO Y LA TALLA EN RANAS DE LP Y SPT.

Resultado de regresión lineal de los valores de LNC y Peso transformados a logaritmo natural para hembras y machos juveniles de un año (línea azul) y hembras y machos reproductores de tres años (línea roja). Los puntos son las observaciones individuales y las áreas de color más claro son el intervalo de confianza del 95%.

HEMATOLOGÍA

En cuanto a la hematología general que se observa en la Tabla 2, el hematocrito varió de acuerdo a la localidad de muestreo ($F= 24.1229$, $p<0.001$), y se encontraron niveles más bajos en la localidad SPT. Por otro lado, el conteo global de células blancas, fue el mismo para las ranas de ambos sexos y de las dos localidades ($F= 0.1723$, $p= 0.6799$ y $F=0.0161$, $p=0.8995$, respectivamente). Por otro lado, el conteo diferencial de células blancas arrojó resultados heterogéneos. Primero, los neutrófilos fueron significativamente menos abundantes en SPT, que en LP, y de los cuatro grupos, los machos de LP presentaron los niveles más altos. En el caso de los linfocitos, no se encontraron diferencias significativas. El conteo de monocitos fue el mismo para LP-H, LP-M y SPT-H, mientras que los machos de SPT tuvieron niveles tres veces mayores que las hembras de la misma localidad, y 6.5 veces mayores en comparación a las ranas de LP. Por último, los basófilos y los eosinófilos se encontraron en igual número en todos los grupos de animales.

DESAFÍO INMUNITARIO

Al evaluar la respuesta inflamatoria a la fitohemaglutinina-P (PHA), se encontró que no hubieron diferencias significativas entre localidades en ninguno de los tiempos en los que se midió el progreso de la inflamación (Fig. 9). Lo que se observa en las tres localidades evaluadas, es que a las tres horas hay un incremento pronunciado de la inflamación, el cual aumenta progresivamente hasta las 36 horas. Después disminuye, hasta desaparecer la respuesta a las 48 horas.

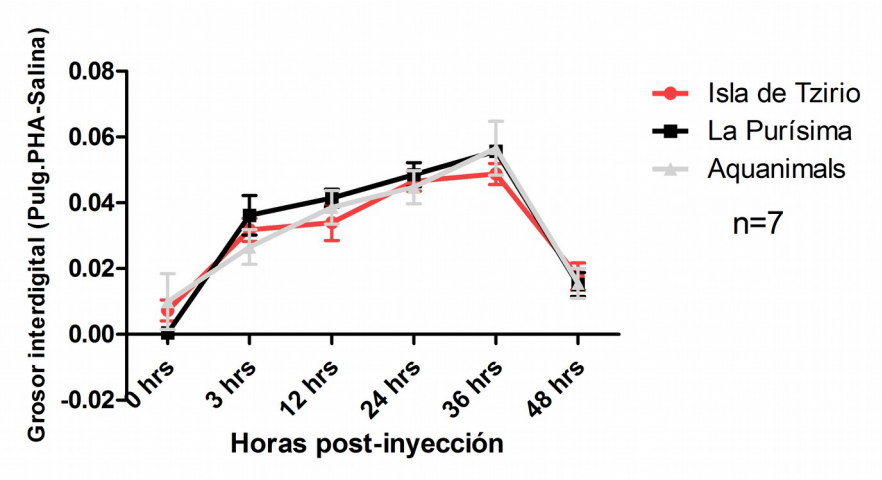

FIGURA 9. RESPUESTA INFLAMATORIA A LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE PHA.

Medición de la inflamación de la membrana interdigital del pulgar derecho del miembro anterior, en seis horarios diferentes para evaluar la respuesta inflamatoria a la administración de fitohemaglutinina-P (PHA). Se usaron animales juveniles de un año de edad de las localidades TZI, LP y COR.

TABLA 2. ANÁLISIS HEMATOLÓGICO DE RANAS JUVENILES DE UN AÑO DE EDAD**.**

Se muestran los valores promedio ± el error estándar del hematocrito, conteo global de células blancas, número de neutrófilos, linfocitos, monocitos, basófilos y eosinófilos. Las ranas utilizadas provinieron de las localidades LP y SPT. El hematocrito está expresado en porcentaje (%) del volumen de sangre, el CBG como número de células blancas por cada microlitro de sangre (#/µl), y las demás variables están expresadas en número de células totales, tomando en cuenta CGB como el 100%. Las letras a un costado, representan la agrupación estadística como resultado de una prueba post-hoc de Tuckey ($p<0.05$), sobre una prueba de ANOVA.

DISCUSIÓN

El análisis de la fisiología que se llevó a cabo, demuestra que el fenotipo es variable entre poblaciones de la especie *L. catesbeianus*. Al igual que como ocurre con la morfometría, la localidad y el sexo, tuvieron efectos significativos en las variables exploradas. Además, la edad de los individuos también mostró tener influencia en la variabilidad fenotípica. La condición corporal es una medida del estado nutricional de un animal, con relación a la cantidad relativa de proteína y ácidos grasos, o mejor dicho la cantidad de energía que un animal ha acumulado, e indica la salud y estado general (Schulte-Hostedde et al., 2001). Los resultados que se obtuvieron del Índice de Masa Escalar son interesantes debido a que todos los organismos evaluados fueron criados y alimentados *ad libitum*. Entonces, las diferencias que se observaron, no pueden deberse a la cantidad o a la calidad de la dieta. De acuerdo con Reading y Clarke (Reading and Clarke, 1995), la densidad de larvas, la lluvia y la temperatura climática son factores que afectan directamente la condición corporal de anuros. También se sabe que el estado de hidratación, el llenado intestinal, el estado reproductivo, la edad, el sexo, y la etapa del desarrollo, son factores que no están relacionados con la ingesta calórica pero que afectan la condición corporal (MacCracken and Stebbings, 2012). Es interesante entonces notar que tanto la localidad ($F= 47.37$, $p<0.001$), y el sexo ($F= 47.37$, $p=0.007$), tuvieron un efecto sobre el comportamiento de los datos en individuos reproductores. Comparando los resultados con el único estudio sobre Rana toro en México, se aprecia que la condición corporal en adultos de vida libre tiende a ser menor que en cautiverio. La condición tanto de machos, como hembras de Tepic (Nayarit) y Jiutepec (Morelos), es menor en comparación con los datos de LP, SPT y TZI, y son similares a la de COR y COP (Reynoso, en prep.). Esta diferencia concuerda con las diferencias en la calidad y cantidad de alimento. Por otro lado, en los individuos juveniles, sólo la localidad tuvo un efecto significativo ($F= 54.71$, $p<0.001$). En la rana *Duttaphrynus melanostictus*, también se observa que el sexo influye la condición corporal, y ésta se relaciona negativamente con metabolitos de corticosterona en la orina (Narayan and Gramapurohit, 2016). También se ha observado que la condición corporal está asociada con algunos caracteres sexuales secundarios en la rana *R. clamitans* (SCHULTE-HOSTEDDE and SCHANK, 2009). Por otro lado, cuatro especies distintas de ranas viviendo cerca de zonas de cultivo intensivo con una alta carga de agroquímicos (en las Pampas, Argentina), presentan un índice de condición disminuido en comparación a las que viven en hábitats no perturbados. Además, los niveles de actividad de algunas enzimas hepáticas, como la catalasa o la colinesterasa, se hayan alterados en

estas ranas (Brodeur et al., 2011). En nuestro estudio, ambas localidades, LP y SPT, se ubican dentro del distrito de riego de la cuenca Lerma-Chapala, y se sabe que la presencia de agroquímicos es alta y constante (Cotler et al., 2006). Resultaría interesante saber si estos contaminantes también están presentes en el agua de los invernaderos con los que se trabajó para buscar un posible efecto de éstos sobre la condición corporal.

En estudios ecológicos es vital conocer los efectos por separado del tamaño estructural y de las reservas de energía en la condición de un organismo, ya que ambos aspectos pueden tener consecuencias importantes en la sobrevivencia, adecuación y en el uso del hábitat (Peig et al., 2009). Un ejemplo de la importancia de la dieta en la determinación de la condición corporal, es la rana alpina *Ichthyosaurra alpestris;* viviendo en localidades a mayor altitud sobre el nivel del mar tienen una mayor condición corporal donde compensan su dieta con huevos y larvas de *Rana temporaria (Sztatecsny et al., 2013).* En un estudio similar, se encontró que la rana de patas amarillas (*Rana mucosa*) se alimenta de larvas de otras tres especies de anuros en sitios donde otras presas escasean, y es en éstos donde su condición corporal es mayor(Pope and Matthews, 2002). En el presente estudio, las condiciones experimentales en las que se desarrollaron los animales muestreados son muy diferentes. Se usaron ranas criadas en invernadero, alimentadas *ad libitum*, con comida comercial para truchas, lo que hace difícil suponer que la calidad de alimento pueda tener un efecto en el IME. A pesar de que no se evaluaron las reservas de lípidos o carbohidraos directamente, no hay razón para creer que con una dieta tan seleccionada, con total disponibilidad y condiciones de temperatura semi-controladas, el estado nutricional sea lo que afecta la condición corporal en los resultados. Otra hipótesis que surge es que la temperatura dentro de los invernaderos tiene un efecto sobre el consumo máximo de alimento y en la asimilación de nutrientes. Esto ocurre en dos especies de peces diferentes y en ambos casos se presenta una relación no-linear de la temperatura y ambas variables(Songguang et al., 2004; Gilannejad et al., 2017).

Tomando en cuenta que el tamaño corporal varía de acuerdo a la localidad del muestreo y también al sexo, hay evidencia para creer que es este rasgo es lo que influencia la variabilidad de la condición corporal. El tamaño corporal en anuros se relaciona con la tasa de fecundidad en hembras y con el comportamiento de apareamiento en machos (Blanckenhorn, 2000). De acuerdo con Howard (Howard, 1981), en la rana toro ocurrió una selección de tamaño en favor de hembras que producen

grandes masa de huevos, y de machos que defienden su territorio de apareamiento. Los resultados obtenidos del tamaño corporal en individuos juveniles y reproductores son consistentes con un estudio dentro de un sistema de producción intensiva de rana toro en Brasil (Lima et al., 1998), y también concuerdan con otro estudio en el sur de Brasil, pero con una población introducida de vida libre (Boelter and Cechin, 2007). Nosotros encontramos que el tamaño corporal tiene una tendencia a ser mayor en hembras que en machos adultos (t = 1.98, p =0.055). Al comparar únicamente organismos adultos de LP y SPT, lo que observamos es que también hay una tendencia, pero los grupos no se diferencian estadísticamente (Tuckey p=0.05). En este mismo sentido, los estudios en vida libre aportan resultados heterogéneos. En el único estudio en México para esta especie, se reportó que el tamaño corporal entre hembras y machos adultos no varía. Comparando los datos de dicho estudio, además, se encontró que las ranas en vida libre pueden alcanzar tallas más grandes que las que en el presente estudio se registraron, aunque también se presenta una condición corporal menor (Reynoso, en prep.). En una población nativa de rana toro en el estado de Michigan (EU), las ranas hembra son significativamente más grandes que los machos. Sin embargo, éstas se deben a que los machos tienen una mayor mortalidad, especialmente los machos grandes (Howard, 1981). En Montreal, estado de Quebec (Canadá), se observó que las hembras tienen un tamaño corporal mayor, y crecen a una menor tasa que la de los machos (Bruneau and Magnin, 1980). Algo similar ocurre en Ontario, en donde las hembras tardan cuatro años en alcanzar su madurez reproductiva, mientras que los machos tardan tres (L. J. Shirose, R. J. Brooks, J. R. Barta, 1993). En Columbia Británica, fuera del rango nativo de distribución de la rana toro, no se observa este marcado dimorfismo, ni en la talla a la madurez sexual, ni en la tasa de crecimiento (Govindarajulu et al., 2006). Por último, en la provincia de Yunnan, China, la altitud es la que afecta el dimorfismo sexual. Las ranas toro que viven en una altitud menor, tienen un mayor tamaño y un dimorfismo sexual mucho más evidente que las que habitan zonas con menor altitud. En ambos casos las hembras son más grandes que los machos(Xuan et al., 2009). Todos estos hallazgos indican que la talla de las ranas toro varía según el sexo y la geografía. De esta manera se explica que aún en las condiciones controladas de este estudio y con comida *ad-libitum,* el tamaño corporal presente variaciones importantes, las cuales son generadas por el efecto de la localidad y su interacción con el sexo.

Otro rasgo importante a considerar en la variabilidad del tamaño corporal es la edad. Los resultados obtenidos, indican que las ranas en SPT crecen más rápido que en LP, ya que las ranas de un año de edad, tienen tanto un LNC e IME mayores (Figs. 6 y 7). Esto

no ocurre en organismos de tres años, en donde parece ser que se ha detenido el crecimiento; las diferencias de LNC y de IME no son evidentes (Fig. 7). Anteriormente se ha descrito que la rana toro tiene un crecimiento asintótico: los primeros años durante la maduración sexual hay un crecimiento muy rápido, y éste casi se vuelve muy lento cuando los organismos alcanzan su madurez sexual. En el caso de los machos siempre es más rápido que en las hembras, tres años en comparación a cinco. Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente, éstos alcanzan tallas menores que las hembras (Shirose et al., 1993). Halliday y Verrell (1988), encontraron que lo que determina el tamaño corporal en *Triturus vulgaris*, no es la edad, si no la taza de crecimiento previa al primer evento de reproducción. Este hallazgo también se observa en diferentes especies de anfibios y reptiles (Halliday and Verrell, 1988). Toda esta evidencia sugiere que durante la maduración sexual, ocurre un cambio en la alocación de recursos disponibles para el crecimiento. Mientras son juveniles, la energía se usa principalmente para el crecimiento corporal, y mientras ocurre la maduración sexual, comienza a utilizarse para los procesos reproductivos (Halliday and Verrell, 1988; McGarrity and Johnson, 2009). Al observar la fig. 9, se aprecia que lo mismo ocurrió en las ranas de SPT y LP: la relación entre estas variables cambia con la edad. El coeficiente de determinación y la pendiente de la regresión son mayores para juveniles que para reproductores. Estos hallazgos también concuerdan con estudios previos en Columbia Británica, Ontario y Quebec, en tanto que la diferencia en la talla se observa hasta el quinto o sexto año post-metamórfico, cuando las ranas maduran sexualmente (Bruneau and Magnin, 1980; Shirose et al., 1993; Govindarajulu et al., 2006). En nuestro estudio, los tiempos son mucho más cortos (la mitad del tiempo), debido a las altas temperaturas dentro de los invernaderos y el contenido calórico de su dieta. Sin embargo, es interesante que aún se expresa el dimorfismo en la talla cuanto más maduras sexualmente son las ranas.

Las variables hematológicas se comportaron muy similares en las dos localidades muestreadas y entre ambos sexos (Fig. 10, Tabla 1). El sistema inmunológico entre vertebrados en general no varía y las funciones que los leucocitos desempeñan también son muy conservadas (Arikan H, 2014). El conteo de glóbulos blancos totales, no presentó diferencias entre las dos localidades ni entre sexos ($F= 0.1723$, $p= 0.67$; $F=0.01$, $p=0.89$), lo que era de esperarse debido a que normalmente las anormalidades en este conteo se deben a estrés ambiental, cosa que no ocurre en los invernaderos de muestreo (Davis et al., 2008). Por otro lado, los valores del hematocrito (PCV) fueron distintos entre la localidad de LP y SPT (Tabla 1), pero se mantuvieron dentro del rango normal para la rana toro(COPpo et al., 2005). Tomando en cuenta los valores hematológicos de distintas

especies de anuros en un gradiente altitudinal en Chile, se sabe que el volumen de los eritrocitos tiene una muy alta correlación negativa con la altitud (Rosenmann and Veloso). Este hallazgo puede explicar en parte la diferencia del hematocrito encontrada, ya que la localidad de Toluca se encuentra cerca de 900 metros arriba de la localidad de la Purísima (2,667 vs 1,800 msnm). Sin embargo, este dato debe ser calculado especialmente para poder tener una interpretación objetiva. En este sentido,, en el ave Págalo grande (*Catharacta skua*), se pudo determinar que el volumen de los eritrocitos dan una mejor aproximación tanto a procesos hematológicos como fisiológicos (1999). Por otro lado, los resultados obtenidos del conteo diferencial de leucocitos, son consistentes con los que hay reportados para ranas toro criadas en invernaderos. En ambos casos, los neutrófilos son los más abundantes (52.85%), seguidos de los linfocitos (29.33), basófilos (8.8%), eosinófilos (5.42) y monocitos (2.93). También coinciden con los valores para neutrófilos, linfocitos y eosinófilos en la rana leopardo del norte, *R. pipiens* (Shutler and Marcogliese, 2011). Al analizar los datos, el valor que se encuentra desproporcionalmente por arriba de los demás, es el de monocitos en ranas macho de SPT. Los conteos altos de este tipo celular, están asociados a infecciones crónicas bacterianas, lo que es muy común en invernaderos con una alta densidad de individuos. Los valores de neutrófilos, por su parte, fueron mayores en LP, y éstos se asocian con episodios agudos de infecciones (Allender and Fry, 2008). Entonces, es muy posible que en las dos localidades haya condiciones propicias para el desarrollo de enfermedades infecciosas que provocan la variabilidad en los conteos diferenciales.

La prueba de PHA, se ha probado en pocas especies de anfibios y reptiles (Brown et al., 2011), e incluyendo este estudio se puede decir que es una prueba que puede extenderse a más especies. A diferencia de otras variables fisiológicas que variaron con respecto a la localidad, la PHA no presentó diferencias significativas (Fig. 11). Si bien, se requiere completar el análisis con ranas hembra y macho de al menos las localidades LP y SPT, brinda una buena aproximación de que la respuesta inflamatoria es robusta. Por otro lado, los resultados que se obtuvieron fueron en parte similares a los reportados para *Rhinella marina*, en cuanto a que la respuesta comienza de manera abrupta hacia las primeras horas después de la inyección de PHA. Sin embargo, en *R. marina* el desafío inmunitario tarda 72horas en resolverse (Brown et al., 2011, 2015). En la rana *R. temporaria*, la respuesta es más corta, de 24 horas (Gervasi and Foufopoulos, 2007), mientras que en el cocodrilo de agua salada (*Crocodylus porosus*) dura sólo 12 horas(Zuk et al., 2002).

A la fecha no se han propuesto mecanismos moleculares distintos a la variación genética que subyazcan la variabilidad fisiológica. Sin embargo, estudios recientes, indican que los mecanismos de regulación epigenética, implicados en la herencia de información y el desarrollo de nuevos fenotipos pueden ser responsables de esta variabilidad fenotípica. Por ejemplo, se demostró que existe una plasticidad transgeneracional en el crecimiento del pez *Cyprinodon variegatus*, como consecuencia de la temperatura ambiental a la que son expuestos organismos parentales. Al estar expuestos por treinta días a altas temperaturas (34°C en comparación a 24 y 29), los peces parentales dan lugar a una progenie se desarrolla hasta 30% más rápido (Salinas and Munch, 2012). En ratones, ocurre una impronta y un efecto transgeneracional por una condición de obesidad en hembras gestantes. Ésta resulta en un aumento del tamaño corporal de hembras en por lo menos tres generaciones (Dunn and Bale, 2011). Por último, el incremento en la condición corporal en humanos, está asociado con un incremento en los niveles de metilación del locus HIF3A, tanto en células circulantes en sangre como en tejido adiposo (Dick et al., 2014). Aún cuando estos estudios comienzan a dar luz sobre una posible relación de la variabilidad fisiológica y los mecanismos de regulación epigenética, aún falta demostrar su relación en especies y contextos ecológicos diversos.

CONCLUSIONES

Los caracteres fenotípicos relacionados con la fisiología de la rana toro son variables aún en condiciones de cautiverio, con alimentación *ad libitum* y sin presiones de selección sexual o natural. La variabilidad encontrada se explica en mayor medida por las diferentes localidades donde fueron muestreadas las ranas. Esto sugiere que aún dentro de invernaderos, hay factores climáticos que afectan la fisiología de los individuos. Dichos factores aún por conocer, tienen un efecto sobre las ranas dependiendo de la edad y el sexo de éstas. Las ranas muestreadas son dimórficas sexualmente en cuanto al tamaño corporal a partir de los tres años de edad. Por último, si bien hay variables que variaron significativamente, hay otras que son robustas y se mantuvieron sin cambio. La evidencia hallada sugiere la existencia de mecanismos moleculares, distintos a las mutaciones y deriva génica, que son la causa de esta variabilidad fenotípica.

CAPÍTULO 3

ESTUDIO CORRELATIVO LOS NIVELES DE METILACIÓN GLOBAL DE ADN, EN MUESTRAS DE SANGRE DE RANAS DE LAS DISTINTAS LOCALIDADES.

El presente capítulo comprende el artículo titulado“Global DNA methylation, as estimated in blood samples, does not correlate with variations of body condition, anatomical features and hematological parameters in captive breed American bullfrogs (Lithobates catesbeianus, Shaw 1802).”, enviado para su publicación a la revista PeerJ, el día 5 de Diciembre de 2018.

Global DNA methylation, as estimated in blood samples, does not correlate with variations of body condition, anatomical features and hematological parameters in captive breed American bullfrogs (*Lithobates catesbeianus,* Shaw 1802).

Braulio Ayala-García[1]*, Alma L. Fuentes-Farías[2], Gabriel Gutiérrez-Ospina[1].

Affiliation

[1]Laboratorio de Biología de Sistemas, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Ciudad de México, México.

[2]Laboratorio de Ecofisiología Animal, Departamento de Zoología, Instituto de Investigaciones Sobre Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58341, Morelia, Michoacán, Mexico.

ABSTRACT

Different levels of Global DNA Methylation (GDM) could have facilitated the emergence of new species, without relying on gene mutations, through promoting ontogenetic phenotypic plasticity. If this assertion was correct, one could expect individuals of the same species living under distinct environmental conditions to be genetically similar, but having different GDM levels and being phenotypically divergent. We tested this presumption by studying the relationship between variability of functional morphological traits and GDM levels in American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*), in green houses located in two geographical sites. Our analyses revealed that body linear morphometry, skull geometry, scaled mass index, packed cell volume and neutrophil counts differed significantly among males and females within and between localities. GDM, nonetheless, was rather similar among sex and locality groups. These results show that levels of GDM, at least under our experimental contexts, does not correlate with functional morphological trait variability.

Keywords: epigenetics, DNA methylation, bullfrog, phenotypic variability, scaled mass index, morphometrics, hematology.

INTRODUCTION

Shifts in DNA methylation are one of the epigenetic processes that are presumed to contribute to generate non-mutational phenotype variability, within and across animal populations by coding environmental information(Baerwald et al., 2016). It is by modulating the degree of transcriptional elongation(Rountree and Selker, 1997) and chromatin compaction/relaxation (Bogdanovic et al., 2011), that DNA methylation regulate patterns of gene expression and ontogeny (Dunican et al., 2008). Methylation takes place in the fifth carbon of cytosine residues (i.e., 5-methyl-cytosine), within gene bodies, enhancers and promoter regions, in intergenic regions, among others (Stancheva et al., 2002). The chemical reaction involved in this process is catalyzed by a family of methyl-transferase enzymes(Stancheva et al., 2001).

Different levels of Global DNA methylation (GDM) occur among vertebrate classes and orders(Vanyushin et al., 1973). Nowadays, it is presumed that shifts in global DNA methylation (GDM) are important for understanding phenotype plasticity promoted by daily live interaction of the organism with the environment(Zhu et al., 2012), and hence, favor non-mutational phenotype variability during vertebrate evolution(Ponger and Li, 2005). For instance, monotremes have the highest levels of methylated DNA, followed by placentals and marsupials. In a similar vein, amphibian and fish DNA is about twice as methylated as that of reptiles, birds and mammals(Jabbari et al., 1997). Therefore, shifts in GDM are thouhght to have contributed in driving the “cold to warm transition” during vertebrate evolution(Varriale and Bernardi, 2006b). That environmental factors may shift GDM, is supported by reports that show that fish living near the poles have higher values of GDM, as estimated in blood samples, than those reported for fish living in temperate or tropical areas(Varriale and Bernardi, 2006a). Since differences in GDM were reported to occur in fish species whose phylogenetic relatedness is high, the results reported further support that interspecies GDM in part reflects differential environmental exposure(Varriale, 2014). However, it remains unclear whether this might be true for phenotype variability observed in individuals of a single species that are exposed to distinct environments.

Domestication and artificial selection has traditional been a powerful tool to infer rules governing the evolution of species(Rivas Sanchez and Rivas Sanchez, 2015). Here, we turn to this strategy to evaluate whether trait variability, as analized through linear morphometry, skull geometric morphometry, body condition, whole white blood cell count, packed cell volume (PCV) and differential leukocyte counting, is correlated with GDM levels in bullfrogs subjected to distinct environments. Bullfrogs are an adequate experimental unit since their colonies display reduced genetic diversity(Bai et al., 2012),

but a great deal of phenotypic plasticity. In fact, this ability has made bullfrogs rather successful dwellers, They have literally colonized a variety of habitats throughout the globe (Govindarajulu et al., 2006).

MATERIALS AND METHODS

A total of sixty bullfrogs (*L. catesbeianus;* 1 year old; 15 males / 15 females per locality, *n*=15) were obtained from "La Purísima" (LP) and "San Pedro Tlaltizapán" (SPT), two rustic greenhouses located at the State of Michoacán (19°52'11"N, 101°01'23"W) and at the Estado de México (19°20'11''N, 99°49'79''W), respectively. LP (6033,465 ft) is about 6°C warmer than in SPT (8448,163 ft) through the year. In both sites male and female frogs were kept captive in groups of 100 individuals that co-inhabited large, cement–made tanks (2.5m^2). Frogs were fed twice a day with commercial trout food provided by a local supplier (El Pedregal, Toluca, Estado de México; composition: 45% protein, 16% fat, 2.5% fiber, 12% ash, 12% humidity). Animal handling and experimentation followed federal guidelines recommended by the Mexican Official Norm on production, housing and handling of laboratory animals (NOM-62-ZOO-1999).

Body condition was estimated in LP and SPT, male and female bullfrogs by using the Scaled Mass Index(MacCracken and Stebbings, 2012). This condition index (CI), is better than the OLS residual method and other CI's because it correlates better with fat reserves and lean dry mass in reptiles and mammals (Peig et al., 2009). The SMI was calculated using the following formula:

$$IME = Mi\left[\frac{Lo}{Li}\right]^{bsma}$$

Where *Mi* and *Li* stand for individual mass and snout-vent length, *Lo* is the arithmetic mean of all the animals sampled, and "*bsma*" is the coefficient of a standard major axis regression for all the mass and length data from both male and female, mature and immature individuals.

Blood cell composition was evaluated in blood samples obtained from juvenile, male and female bullfrogs anesthetized with ice following guillotine decapitation. Blood was collected in EDTA-treated tubes and stored at -4°C. Packed cell volume (PCV) was estimated after centrifuging 2ml of blood at 4,500 rpm for 15 minutes, and then measuring the volume of both serum and hematocrit. Leukocyte counts (WBC) were done in a hemocytometer after conventional Turk-solution treatment (for at least 5 minutes) of

blood samples. Leukocyte differential counts were done on blood smears stained with Wright reagent for 5 minutes. A total of 100 cells in each smear were counted and classified as lymphocytes, neutrophils, monocytes, basophils and eosinophils, following specific guidelines of amphibian hematology (Allender and Fry, 2008).

Linear morphometric analysis was done on 7 lineal measurements taken with a precision Veneer caliper (0.01 cm error). Measures include snout-vent length, head width and length, timpanum and eye diameter, leg size (femur plus tibio-fibula), feet (tarus plus metatarsus). For the geometric analysis, we used 10 skulls (n=10) that were hand cleaned with disecting tools. Digital photographies from the ventral aspect of the skull were taken and used to place ten landmarks as suggested for the *Rana* genus (Supplementary fig. 1) (Larson, 2002, 2005). TpsUtil and Tps2 (James Rohlf, Stony Brook University) software was used to generate landmark information from the digital images.

DNA was isolated from blood samples using the propanol extraction protocol (Miller et al., 1988). DNA concentration and purity was estimated using a Nano-drop 1000 (Thermo-Fisher, Waltham MA, USA). DNA integrity was evaluated using 1% agarose gel electrophoresis. The percentage of 5-methylcitosine was estimated using an ELISA kit following manufacturer´s protocol (Zymo D5326, Irving CA, USA). Briefly, 100ng of double stranded DNA were denatured and placed in 96-well plates. Each well was treated with primary and secondary antibody (coupled to HRP). Following several washes, HRP activity was revealed by adding 100 µl of manufacturer's HRP developer during 10 to 60 minutes at room temperature. Absorbance was estimated at 480 nm in an ELISA plCORe reader (Biotek, Winooski VT, USA). The percentage of DNA methylation in each sample was calculated after fitting logarithmic second-order regression on the manufacturer's standard curve absorbance values.

Morphological data from both groups were compared by using a multivariate analysis conducted through canonical discriminant tests (CDA). We used JMP statistical software (SAS, version 10) and MorphoJ 2.0 (Obtained from Klingenberg's lab official site:http://www.flywings.org.uk/morphoj_page.htm). CV1 and CV2 were used to perform Two-way ANOVA (R 3.1.1) on linear morphometrics; for geometric analysis, Mahalanobis procruster distance was calculated (MDA. MorphoJ 2.0). Body condition, whole white blood cell count, packed cell volume and differential leukocyte number are presented as mean ± SE. After testing equal variance, Shapiro-Wilk test was used to ensure normality of the data. To test differences between groups from body condition, hematology and GDM variables, we used a One-way ANOVA followed by a Tuckey post-hoc test, with an alpha level of < 0.05. R 3.1.1 was used for statistical analysis and Sigma Plot 12 to create graphs.

RESULTS AND DISCUSSION

In this experiments, both female and male bullfrogs were larger in SPT than in LP. The overall morphometry between females from both sites was similar, whereas differences could be seen in their male counterparts (Fig. 1A). Differences between female and male frogs from LP were greater than in SPT, thus sex and locality exert a combined effect. (2-ANOVA; p=0.0004). This results suggests that sexual dimorphism is present at both sites but is more noticeable in LP. On the other hand, skull geometry behaved differently in both populations (Fig. 1B). In LP, there was a sharp difference between female and male skull shape (p<0.0001). This was not observed in SPT (MDA; p=0.1). Lastly, even though no differences in skull shape were documented between females of both localities (MDA; p=0.2), males did differ significantly (MDA; p<0.0001). Body condition, as estimated by the Scaled Mass Index, differed between LP and SPT bullfrogs (Fig. 1C). Both male and female frogs from SPT had a higher body condition than LP ones (ANOVA, p<0.0001).

As shown in Table 1, PCV levels were higher in both male and female frogs from LP than SPT animals (ANOVA; p<0.0001). WBC counts on the contrary, did not differ between among groups (ANOVA; p=0.96). Overall, neutrophil number was greater in LP than in SPT. In the former locality, nonetheless, neutrophil number was higher in male than in female frogs (ANOVA; p<0.05. Table 1). In SPT, monocyte number was 3.4-fold higher in males than in females. In addition, monocyte number of males from SPT was 6.9-fold higher than that observed in specimens of both sexes raised in LP (Table 1).

Global DNA methylation estimated in blood samples showed neither differences between sex (p= 0.978) or locality (p= 0.236) (Fig. 1D). Moreover, there was no correlation between this variable with any of the others. A multivariate analysis of the phenotypic variation in response of GDM did not any significant correlation (not shown)

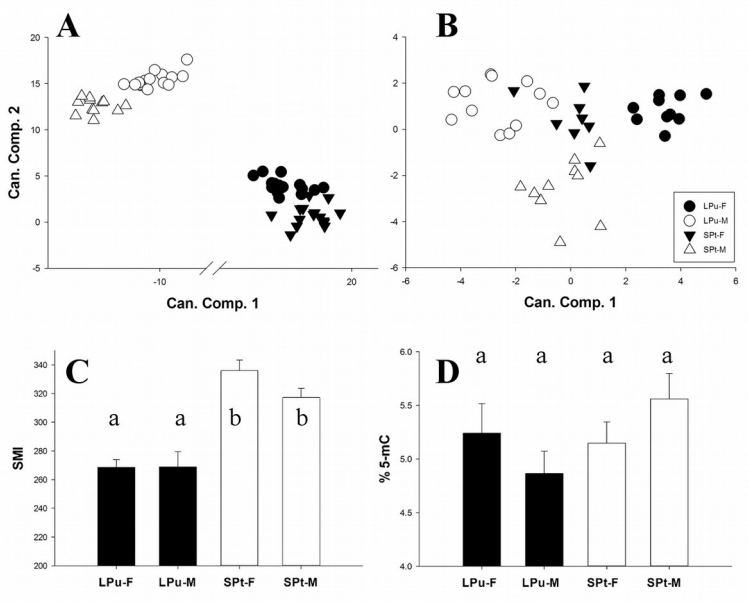

FIGURA 10. FIGURE 1.

(**A**) Canonical variate analysis performed on 7 lineal measurements for linear morphometrics , and (**B**) on ten landmark extracted from ventral digital photos of the skull of female and male bullfrogs. Canonical component (CP) 1 was plotted against CP2 for every frog. A total of 30 frogs (15 female and 15 male, *n*=15) were used for linear morphometrics and 20 skulls (10 female, and 10 male, *n*=10) from each of the two localities. Black circles correspond to LP females, open circles to LP males, black triangles to SPT females and open triangles to males. Mean ± SE of (**C**) Scaled mass index and (**D**) global percentage of 5-mC, measured from blood samples (*n*=15). Letters indicate statistical significance after Tuckey post-hoc test on a One way-ANOVA.

The fact that GDM did not correlate with any phenotypic variable is interesting since sex and the environment influenced morphometric and physiological trait variability and recent evidence suggested that GDM may participate in the process of generating non-mutational phenotypic variability in natural conditions (Varriale, 2014). This is at odds with previous studies that show bullfrogs living out of their native range exhibit a highly variable phenotype that could be attributed to the effect of being exposed to distinct environmental niches (Govindarajulu et al., 2006). in the same sense, fish species belonging to the same family are known to have different GDM levels depending on the temperature they are exposed to. This indeed is the case for *Symphodus tinca*, a Mediterranean fish that exhibits the highest levels of GDM among the members of Labridae family (Varriale and Bernardi, 2006a). Moreover, expecting that GDM levels could differ between bullfrogs from SPT and LP was a reasonable presumption since even different organ within single individuals may have different GDM levels, as shown in rats, mice and monkeys (Gama-Sosa et al., 1983). Although we do not currently have an explanation for these counterintuitive results, it is fair to say that we cannot rule out fully that global methylation is unrelated with trait variability since differential methylation may occur in distinct genes throughout the genome for individuals coming from one locality or the other. Accordingly, ELISA GDM analysis may not be the correct tool for approaching inter-individual variation within single species. It may be more instructive to

analyze global patterns of DNA methylation as shown for fish (Baerwald et al., 2016), birds (Liebl et al., 2013), reptiles (Venegas et al., 2016) and mammals (Chang et al., 2006).

	PCV (%)		WBC # /µL		Neutrophils #/WBC		Lymphocytes #/WBC		Monocytes #/WBC		Basophils #/WBC		Eosinophils #/WBC	
LP-F	**34.6**±0.88	**a**	**3584.6**±239	**a**	**1154.27**±169	**ab**	**1997.16**±225	**a**	**36.61**±8.63	**a**	**230.55**±51.1	**a**	**125.83**±26	**a**
LP-M	**35.9**±0.91	**a**	**3746.6**±176	**a**	**1464.53**±128	**b**	**1791.14**±103	**a**	**31.07**±7.6	**a**	**233.17**±49	**a**	**197.92**±49	**a**
SPT-F	**27.2**±1.39	**b**	**3797.7**±355	**a**	**730.84**±63.5	**a**	**2093.4**±236	**a**	**68.69**±19.8	**a**	**413.32**±75.9	**a**	**191**±29.4	**a**
SPT-M	**29.5**±1.21	**b**	**3731.8**±324	**a**	**933.61**±120	**a**	**1927.84**±189	**a**	**233.65**±40.8	**b**	**349.13**±53	**a**	**236.27**±50	**a**

TABLA 3. TABLE 1. HEMATOLOGICAL PARAMETERS

Packed cell volume, whole blood cell count and the five principal cell types in blood samples were measured in 15 male and 15 femal frogs from two localities (LP and SPT, *n*= 15). Mean and SE are reported, and letters indicate statistical significance after Tuckey post-hoc test on a One way-ANOVA.

In this work, we found no correlation between morphological nor physiological traits with levels of GDM. However, our results show that intraspecific sex variability is also present in bullfrogs even under relatively controlled conditions (Figs. 1A-B), thus suggesting that sexual dimorphism in bullfrogs can be influenced by environmental factors. Future studies must establish whether global patterns of DNA methylation can explain these interesting findings.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Jesús Ramírez Santos, T.L.Q. Pablo Pintor Ríos and Dr. Margarita Gómez Chavarín for their technical support. We also thank Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal (UNAM), and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), through which this study was conducted. This study was funded with institutional resources of the Instituto de Investigaciones Biomédicas of the Universidad Nacional Autónoma de México. The first author was a PhD student granted by the CONACYT.

REFERENCES

Allender, M.C., and Fry, M.M. (2008): Amphibian hematology. Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract. **11**: 463–80.

Baerwald, M.R., Meek, M.H., Stephens, M.R., Nagarajan, R.P., Goodbla, A.M., Tomalty, K.M.H., et al. (2016): Migration-related phenotypic divergence is associated with epigenetic modifications in rainbow trout. Mol. Ecol. **25**: 1785–1800.

Bai, C., Ke, Z., Consuegra, S., Liu, X., and Li, Y. (2012): The role of founder effects on the genetic structure of the invasive bullfrog (*Lithobates catesbeianaus*). China. Biol. Invasions **14**: 1785–1796.

Bogdanovic, O., Long, S.W., Heeringen, S.J. van, Brinkman, A.B., Gómez-Skarmeta, J.L., Stunnenberg, H.G., et al. (2011): Temporal uncoupling of the DNA methylome and transcriptional repression during embryogenesis. Genome Res. **21**: 1313–1327.

Chang, H.-S., Anway, M.D., Rekow, S.S., and Skinner, M.K. (2006): Transgenerational epigenetic imprinting of the male germline by endocrine disruptor exposure during gonadal sex determination. Endocrinology **147**: 5524–41.

Dunican, D.S., Ruzov, A., Hackett, J. a, and Meehan, R.R. (2008): xDnmt1 regulates transcriptional silencing in pre-MBT *Xenopus* embryos independently of its catalytic function. Development **135**: 1295–302.

Gama-Sosa, M.A., Midgett, R.M., Slagel, V.A., Githens, S., Kuo, K.C., Gehrke, C.W., et al. (1983): Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals. BBA - Gene Struct. Expr. **740**: 212–219.

Govindarajulu, P., Price, W.M.S., and Anholt, B.R. (2006): Introduced Bullfrogs (*Rana catesbeiana*) in Western Canada: Has Their Ecology Diverged? J. Herpetol. **40**: 249–260.

Jabbari, K., Cacciò, S., Païs De Barros, J.P., Desgrès, J., and Bernardi, G. (1997): Evolutionary changes in CpG and methylation levels in the genome of vertebrates. Gene **205**: 109–118.

Larson, P.M. (2002): Chondrocranial development in larval Rana sylvatica (Anura: Ranidae): Morphometric analysis of cranial allometry and ontogenetic shape change. J. Morphol. **252**: 131–144.

Larson, P.M. (2005): Ontogeny, phylogeny, and morphology in anuran larvae: morphometric analysis of cranial development and evolution in Rana tadpoles (Anura: Ranidae). J. Morphol. **264**: 34–52.

Liebl, A.L., Schrey, A.W., Richards, C.L., and Martin, L.B. (2013): Patterns of DNA Methylation Throughout a Range Expansion of an Introduced Songbird. Integr. Comp. Biol. **1**: 1–8.

MacCracken, J.G., and Stebbings, J.L. (2012): Test of a Body Condition Index with Amphibians. J. Herpetol. **46**: 346–350.

Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky, H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. **16**: 1215–1215.

Peig, J., Green, A.J., and Ame, C. (2009): New perspectives for estimating body condition from mass / length data : the scaled mass index as an alternative method. **118**: 1883–1891.

Ponger, L., and Li, W.-H. (2005): Evolutionary diversification of DNA methyltransferases in eukaryotic genomes. Mol. Biol. Evol. **22**: 1119–28.

Rivas Sanchez, D.F., and Rivas Sanchez, D.F. (2015): Identifying potential for fisheries-induced evolution on behavioral traits of a Skagerrak cod (*Gadus morhua*) population. Master thesis dissertation. Univertity of Oslo, Norway.

Rountree, M.R., and Selker, E.U. (1997): DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in Neurospora crassa. Genes Dev. **11**: 2383–95.

Stancheva, I., El-Maarri, O., Walter, J., Niveleau, A., and Meehan, R.R. (2002): DNA methylation at promoter regions regulates the timing of gene activation in *Xenopus laevis* embryos. Dev. Biol. **243**: 155–65.

Stancheva, I., Hensey, C., and Meehan, R.R. (2001): Loss of the maintenance methyltransferase, xDnmt1, induces apoptosis in Xenopus embryos. **20**: 1963–1973.

Vanyushin, B.F., Mazin, A.L., Vasilyev, V.K., and Belozersky, A.N. (1973): The content of 5-methylcytosine in animal DNA: The species and tissue specificity. BBA Sect. Nucleic Acids Protein Synth. **299**: 397–403.

Varriale, A. (2014): DNA Methylation, Epigenetics, and Evolution in Vertebrates: Facts and Challenges. Int. J. Evol. Biol. **2014**: 1–7.

Varriale, A., and Bernardi, G. (2006a): DNA methylation and body temperature in fishes. Gene **385**: 111–121.

Varriale, A., and Bernardi, G. (2006b): DNA methylation in reptiles. Gene **385**: 122–127.

Venegas, D., Marmolejo-Valencia, A., Valdes-Quezada, C., Govenzensky, T., Recillas-Targa, F., and Merchant-Larios, H. (2016): Dimorphic DNA methylation during temperature-dependent sex determination in the sea turtle Lepidochelys olivacea. Gen. Comp. Endocrinol. 236: 35–41.

Zhu, Z.Z., Hou, L., Bollati, V., Tarantini, L., Marinelli, B., Cantone, L., et al. (2012): Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: A combined analysis. Int. J. Epidemiol. 41: 126–139.

CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

El presente trabajo, representa el primer intento por caracterizar rasgos fenotípicos en la rana toro bajo sistemas de producción intensiva en México. Esto sirve como base tanto para desarrollar un manejo zootécnico adecuado en el contexto nacional, como para la instrumentación de programas de selección y mejoramiento de esta especie. Aunque la ranicultura contribuye minoritariamente a la producción acuícola nacional (CONAPESCA, 2018), tiene un gran potencial pecuario por diferentes razones. Primero, existe un mercado internacional para su carne, derivados y también para el uso de animales vivos (FAO, 2005). En México, su producción no ha dejado de crecer, y comienza a generarse un mercado gastronómico nacional (Ávila-Villegas, 2008). Como se observó en este estudio, existe una alta variabilidad fenotípica entre diferentes sistemas de producción, lo cual ayudaría a reducir los índices de endogamia en experimentos de entrecruzamiento, como ha sido hecho antes con peces (Moay et al, 1975; Nielsen et al, 2010, Gierde et al, 2002). Así mismo, existen poblaciones de vida libre en el país (Reynoso, en prep.), que pueden contribuir a que haya una mayor variabilidad en los programas de mejoramiento (Bakos y Gorda, 1995). Por último, recientemente se publicó el genoma completo de la rana toro, posibilitando el diseño de herramientas genómicas que ayudarán a su mejoramiento (Hammond et al, 2017).

La evidencia hallada a lo largo de este estudio, no apoya la hipótesis de que los niveles globales de metilación en sangre, tengan correlación con la variación fenotípica en ranas toro que viven en cautiverio. Esta especie en proceso de domesticación expresa variabilidad morfométrica y fisiológica, consistente con otros estudios en cautiverio y en vida libre. Las respuestas fenotípicas que se observaron por vivir en diferentes localidades, dependen tanto de la edad, del sexo y la interacción entre estos tres factores. Todos estos hallazgos confirman que la rana toro es una especie invasiva con una alta capacidad plástica. Es importante considerar esta característica en el manejo que se le da a esta especie de uso comercial. Sobre todo para evitar nuevos eventos de colonización en hábitats de México, donde puede ocasionar un fuerte impacto en poblaciones de fauna nativa, especialmente de anfibios amenazados.

Por otro lado, se necesitan llevar a cabo más estudios de este tipo para confirmar la validez del modelo teórico propuesto. Primero se deben explorar los niveles globales de metilación en diferentes tejidos, ya que se sabe que en otros vertebrados éstos pueden variar (Gama-Sosa et al., 1983). Por otro lado, se plantea el uso de diferentes técnicas y metodologías para evaluar la metilación del ADN. Analizar patrones de metilación en regiones promotoras, así como en regiones no-codificantes ha dado muy buenos resultados en otros anfibios, mamíferos y aves (Bogdanovic et al., 2011; Skinner, 2011a; Liebl et al., 2013). Por último, usando sistemas experimentales como éste en invernaderos, se podrían complementar trabajos de ecología experimental y biología evolutiva. Comparando poblaciones en vida libre tanto nativas como introducidas y en cautiverio, se pueden evaluar las múltiples y muy distintas presiones de selección sobre rasgos fenotípicos, la genética y epigenética de anfibios.

REFERENCIAS

Abdel-Rahman, E.H., Taylor, P.J., Contrafatto, G., Lamb, J.M., Bloomer, P., and Chimimba, C.T. (2009): Geometric craniometric analysis of sexual dimorphism and ontogenetic variation: A case study based on two geographically disparate species, Aethomys ineptus from southern Africa and Arvicanthis niloticus from Sudan (Rodentia: Muridae). Mamm. Biol. **74**: 361–373.

AG, MX, A., and AR, C. (2001): La introducción y el cultivo de la rana toro (Rana catesbeiana). ¿Un atentado a la biodiversidad de México? Cienc. Ergo Sum **8**:.

Aiken, C.E., Tarry-Adkins, J.L., and Ozanne, S.E. (2016): Transgenerational effects of maternal diet on metabolic and reproductive ageing. Mamm. Genome **27**: 430–9.

Allender, M.C., and Fry, M.M. (2008): Amphibian hematology. Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract. **11**: 463–80, vi.

Allowen Evin, Keith Dobney, Renate Schafberg, Joseph Owen, Una Strand Vidarsdottir, G.L. and T.C. (2015): Phenotype and animal domestication: A study of dental variation between domestic, wild, captive, hybrid and insular Sus scrofa. BMC Evol. Biol. **15**: 289–290.

American Society of Biological Chemists., Rockefeller Institute for Medical Research., and American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Histone H1-mediated inhibition of transcription initiation of methylated templates in vitro. (American Society for Biochemistry and Molecular Biology).

American Society of Biological Chemists., Rockefeller Institute for Medical Research., and American Society for Biochemistry and Molecular Biology. The Journal of biological chemistry. (American Society for Biochemistry and Molecular Biology).

Antonio, R., and Legorreta, M. Informe final* del Proyecto U020 Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales Responsable.

Anway, M.D., Rekow, S.S., and Skinner, M.K. (2008): Transgenerational epigenetic programming of the embryonic testis transcriptome. Genomics **91**: 30–40.

Anway, M.D., and Skinner, M.K. (2008): Epigenetic programming of the germline: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease. Reprod. Biomed. Online **16**:.

Arikan H, C.K. (2014): Haematology of amphibians and reptiles: a review. **10**: 190–209.

Armstroong, L. (2013): Epigenetics.

Avila-Villegas H. 2008. Ficha de La Especie Rana Toro (*Lithobates Catesbeianus*). CONABIO. Consultada el día 25 de enero de 2019. http://www.conabio.gob.mx/invasoras/index.php/Discusi%C3%B3n:Rana_toro

Baerwald, M.R., Meek, M.H., Stephens, M.R., Nagarajan, R.P., Goodbla, A.M., Tomalty, K.M.H., et al. (2016): Migration-related phenotypic divergence is associated with epigenetic modifications in rainbow trout. Mol. Ecol. **25**: 1785–1800.

Bai, C., Ke, Z., Consuegra, S., Liu, X., and Li, Y. (2012): The role of founder effects on the genetic structure of the invasive bullfrog (Lithobates catesbeianaus) in China. Biol. Invasions **14**: 1785–1796.

Bakos J, Gorda S. 1995. Genetic improvement of common carp strains using intraspecific hybridization. *Aquaculture*;129(1-4):183-186.

Bakulski, K.M., Rozek, L.S., Dolinoy, D.C., Paulson, H.L., and Hu, H. (2012): Alzheimer's disease and environmental exposure to lead: the epidemiologic evidence and potential role of epigenetics. Curr. Alzheimer Res. **9**: 563–73.

Bhutani, N., Burns, D., and Blau, H. (2011): DNA Demethylation Dynamics. Cell **146**: 866–872.

Bird, A. (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. **16**: 6–21.

Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O.J., and Macleod, D. (1985): A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. Cell **40**: 91–9.

Blanckenhorn, W.U. (2000): The Evolution of Body Size: What Keeps Organisms Small? Q. Rev. Biol. **75**: 385–407.

Boelter, R.A., and Cechin, S.Z. (2007): Reproductive biology of the invasive bullfrog Lithobates catesbeianus in southern Brazil. Ann Zool Fenn. **44**: 435–444.

Boer, P. de, Ramos, L., Vries, M. de, and Gochhait, S. (2010): Memoirs of an insult: sperm as a possible source of transgenerational epimutations and genetic instability. Mol. Hum. Reprod. **16**: 48–56.

Bogdanovic, O., Long, S.W., Heeringen, S.J. van, Brinkman, A.B., Gómez-Skarmeta, J.L., Stunnenberg, H.G., et al. (2011): Temporal uncoupling of the DNA methylome and transcriptional repression during embryogenesis. Genome Res. **21**: 1313–1327.

Bogdanović, O., and Veenstra, G.J.C. (2009): DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. Chromosoma **118**: 549–65.

Bollati, V., Baccarelli, A., Hou, L., Bonzini, M., Fustinoni, S., Cavallo, D., et al. (2007): Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. Cancer Res. **67**: 876–880.

Brock, P.M., Hall, A.J., Goodman, S.J., Cruz, M., and Acevedo-Whitehouse, K. (2013): Immune activity, body condition and human-associated environmental impacts in a wild marine mammal. PLoS One **8**: e67132.

Brodeur, J.C., Suarez, R.P., Natale, G.S., Ronco, A.E., and Elena Zaccagnini, M. (2011): Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas. Ecotoxicol. Environ. Saf. **74**: 1370–1380.

Brown, G.P., Phillips, B.L., Dubey, S., and Shine, R. (2015): Invader immunology: invasion history alters immune system function in cane toads (*Rhinella marina*) in tropical Australia. Ecol. Lett. **18**: 57–65.

Brown, G.P., Shilton, C.M., and Shine, R. (2011): Measuring amphibian immunocompetence: validation of the phytohemagglutinin skin-swelling assay in the cane toad, Rhinella marina. Methods Ecol. Evol. **2**: 341–348.

Bruneau, M., and Magnin, E. (1980): Croissance, nutrition et reproduction des ouaouarons Rana catesbeiana Shaw (Amphibia Anura) des Laurentides au nord de Montréal. Can. J. Zool. **58**: 175–183.

Bury, R.B., and Whelan, J.A. (1985): Ecology and management of the bullfrog. Resour. Publ.

Carroll, S.B. (2008): Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution. Cell **134**: 25–36.

Champagne, F.A., and Curley, J.P. (2009): Epigenetic mechanisms mediating the long-term effects of maternal care on development. Neurosci. Biobehav. Rev. **33**: 593–600.

Chang, H.-S., Anway, M.D., Rekow, S.S., and Skinner, M.K. (2006): Transgenerational epigenetic imprinting of the male germline by endocrine disruptor exposure during gonadal sex determination. Endocrinology **147**: 5524–41.

Chen, T., and Li, E. (2006): Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **301**: 179–201.

Cheng, X., and Roberts, R.J. (2001): AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. Nucleic Acids Res. **29**: 3784–95.

Coffman, J. a, and Denegre, J.M. (2007): Mitochondria, redox signaling and axis specification in metazoan embryos. Dev. Biol. **308**: 266–80.

Collins, J.P. (1979): Intrapopulation variation in the body size at metamorphosis and timing of metamorfosis in the bullfrog, Rana catesbeiana. Ecology **60**: 738–749.

Cook, M.T., Heppell, S.S., and Garcia, T.S. (2013): Invasive bullfrog larvae lack developmental plasticity to changing hydroperiod. J. Wildl. Manage. **77**: 655–662.

CONAPESCA. 2018. Estadísticas de producción pesquera. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. Consultada el día 8 de enero de 2019. https://www.conapesca.gob.mx/wb/cona/informacion_estadistica_por_especie_y_entidad.

Coppo, J. a, Mussart, N.B., and Fioranelli, S. a (2005): Blood and urine physiological values in farm-cultured Rana catesbeiana (Anura: Ranidae) in Argentina. Rev. Biol. Trop. **53**: 545–59.

Cotler, A., Mazari, H., and Anda, S. de (2006): Atlas de la Cuenca Lerma-Chapala (México, DF.: Instituto Nacional de Ecología, INE-SEMARNAT).

Coulondre, C., Miller, J.H., Farabaugh, P.J., and Gilbert, W. (1978): Molecular basis of base substitution hotspots in Escherichia coli. Nature **274**: 775–780.

Covelo-Soto, L., Saura, M., and Morán, P. (2015): Does DNA methylation regulate metamorphosis? The case of the sea lamprey (Petromyzon marinus) as an example. Comp. Biochem. Physiol. Part - B Biochem. Mol. Biol. **185**: 42–46.

Cyr, A.R., and Domann, F.E. (2011): The redox basis of epigenetic modifications: from mechanisms to functional consequences. Antioxid. Redox Signal. **15**: 551–89.

Davis, a. K., Maney, D.L., and Maerz, J.C. (2008): The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. Funct. Ecol. **22**: 760–772.

Demas, G.E., and Nelson, R.J. (2012): Ecoimmunology (Oxford University Press).

Dick, K.J., Nelson, C.P., Tsaprouni, L., Sandling, J.K., Aïssi, D., Wahl, S., et al. (2014): DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. Lancet **383**: 1990–1998.

Diniz-filho, A.F. (2008): Morphometric and genetic differentiation among populations of. **98**: 493–500.

Djong, T.H., Matsui, M., Kuramoto, M., Belabut, D.M., Sen, Y.H., Nishioka, M., et al. (2007): Morphological divergence, reproductive isolating mechanism, and molecular phylogenetic relationships among Indonesia, Malaysia, and Japan populations of the Fejervarya limnocharis complex (Anura, Ranidae). Zoolog. Sci. **24**: 1197–212.

Dolinoy, D.C., Huang, D., and Jirtle, R.L. (2007): Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **104**: 13056–61.

Dunican, D.S., Ruzov, A., Hackett, J. a, and Meehan, R.R. (2008): xDnmt1 regulates transcriptional silencing in pre-MBT Xenopus embryos independently of its catalytic function. Development **135**: 1295–302.

Dunn, G.A., and Bale, T.L. (2011): Maternal High-Fat Diet Effects on Third-Generation Female Body Size via the Paternal Lineage. Endocrinology **152**: 2228–2236.

Easley, K.A., Culley, D.D., Horseman, N.D., and Penkala, J.E. (1979): Environmental influences on hormonally induced spermiation of the bullfrog,Rana catesbeiana. J. Exp. Zool. **207**: 407–416.

El-Maarri, O., Walier, M., Behne, F., Üüm, J. van, Singer, H., Diaz-Lacava, A., et al. (2011): Methylation at global LINE-1 repeats in human blood are affected by gender but not by age or natural hormone cycles. PLoS One **6**:.

Emerson, S.B. (1986): Heterochrony and frogs:the relationship of a life history trait to morphological form. Am. Nat. **127**: 167–183.

Fan, G. (2011): epigenetics of X chromosome Inactivation (Elsevier Inc.).

FAO. 2005. Rana catesbeiana. Cultured Aquatic Species Information programme. FAO Fisheries and Aquaculture Department. http://www.fao.org/fishery/ culturedspecies/Rana_catesbeiana/es.

Felici, M. De (2011): Nuclear Reprogramming in Mouse Primordial Germ Cells: Epigenetic Contribution. Stem Cells Int. **2011**: 1–15.

Ficetola, G.F., Bonin, A., and Miaud, C. (2008): Population genetics reveals origin and number of founders in a biological invasion. Mol. Ecol. **17**: 773–782.

Ficetola, G.F., Coïc, C., Detaint, M., Berroneau, M., Lorvelec, O., and Miaud, C. (2006): Pattern of distribution of the American bullfrog Rana catesbeiana in Europe. Biol. Invasions **9**: 767–772.

Foundation, P.D.B. (2002): Rana toro. 1–30.

Fuks, F., Hurd, P.J., Deplus, R., and Kouzarides, T. (2003): The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. Nucleic Acids Res. **31**: 2305–12.

Futuyma, D.J. (1998): Evolutionary biology (Sinauer Associates).

Gama-Sosa, M.A., Midgett, R.M., Slagel, V.A., Githens, S., Kuo, K.C., Gehrke, C.W., et al. (1983): Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals. BBA - Gene Struct. Expr. **740**: 212–219.

Garriga, N., and Llorente, G. a. (2012): Chondrocranial ontogeny of Pelodytes punctatus (Anura: Pelodytidae). Response to competition: geometric morphometric and allometric change analysis. Acta Zool. **93**: 453–464.

Gervasi, S.S., and Foufopoulos, J. (2007): Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. Funct. Ecol. 071005010407002–???

Gilannejad, N., Martínez-Rodríguez, G., Yúfera, M., and Moyano, F.J. (2017): Estimating the effect of different factors on the digestive bioaccessibility of protein by the Senegalese sole (Solea senegalensis); combination of response surface methodology and in vitro assays. CORaculture **477**: 28–34.

Gjerde B, Reddy PVG., Mahapatra KD, Jana RK, Meher PK, Sahoo M et al. 2002. Growth and survival in two complete diallele crosses with five stocks of Rohu carp (*Labeo rohita*). *Aquaculture*;209(1-4):103-115.

Goldberg, A.D., Allis, C.D., and Bernstein, E. (2007): Epigenetics: a landscape takes shape. Cell **128**: 635–8.

Gould, S.J.A.Y. (2002): The Structure Of Evolutionary Theory.

Govindarajulu, P., Price, W.M.S., and Anholt, B.R. (2006): Introduced Bullfrogs (Rana catesbeiana) in Western Canada: Has Their Ecology Diverged? J. Herpetol. **40**: 249–260.

Greer, E.L., Maures, T.J., Ucar, D., Hauswirth, A.G., Mancini, E., Lim, J.P., et al. (2011): Transgenerational epigenetic inheritance of longevity in Caenorhabditis elegans. Nature **479**: 365–71.

Guo, J.U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G., and Song, H. (2011): Hydroxylation of 5-Methylcytosine by TET1 Promotes Active DNA Demethylation in the Adult Brain. Cell **145**: 423–434.

Haaf, T. (2006): Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **310**: 13–22.

Halliday, T., and PA, V. (1988): Body Size and Age in Amphibians and Reptiles. J. Herpetol. **22**: 253–265.

Halliday, T.R., and Verrell, P.A. (1988): Body Size and Age in Amphibians and Reptiles. J. Herpetol. **22**: 253.

Hammond, S.A., Veldhoen, N., and Helbing, C.C. (2015): Influence of temperature on thyroid hormone signaling and endocrine disruptor action in Rana (Lithobates) catesbeiana tadpoles. Gen. Comp. Endocrinol. **219**: 6–15.

Hammond SA, Warren RL, Vandervalk BP, Kucuk E, Khan H, Gibb EA et al. 2017. The North American bullfrog draft genome provides insight into hormonal regulation of long noncoding RNA. *Nat Commun*;8(1):1433.

Handrigan, G.R., and Wassersug, R.J. (2007): The anuran Bauplan: a review of the adaptive, developmental, and genetic underpinnings of frog and tadpole morphology. Biol. Rev. **82**: 1–25.

Hanken, J. (1992): Life history and morphological evolution. J. Evol. Biol. **5**: 549–557.

Hannon, G.J. (2002): RNA interference. Nature **418**: 244–251.

Heijmans, B.T., Tobi, E.W., Stein, A.D., Putter, H., Blauw, G.J., Susser, E.S., et al. (2008): Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. **105**: 17046–17049.

Hendrich, B., and Tweedie, S. (2003): The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. Trends Genet. **19**: 269–277.

Hermann, A., Goyal, R., and Jeltsch, A. (2004): The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. J. Biol. Chem. **279**: 48350–9.

Heyn, H., Moran, S., Hernando-Herraez, I., Sayols, S., Gomez, A., Sandoval, J., et al. (2013): DNA methylation contributes to natural human variation. Genome Res. **23**: 1363–72.

Hillis, D.M., and Wilcox, T.P. (2005): Phylogeny of the New World true frogs (Rana). Mol. Phylogenet. Evol. **34**: 299–314.

Hitchler, M.J., and Domann, F.E. (2007): An epigenetic perspective on the free radical theory of development. Free Radic. Biol. Med. **43**: 1023–36.

Howard, R.D. (1981): Sexual Dimorphism in Bullfrogs. Ecology **62**: 303–310.

Hsiung, D.T., Marsit, C.J., Houseman, E.A., Eddy, K., Furniss, C.S., McClean, M.D., et al. (2007): Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **16**: 108–114.

Inoue, A., Shen, L., Dai, Q., He, C., and Zhang, Y. (2011): Generation and replication-dependent dilution of 5fC and 5caC during mouse preimplantation development. Cell Res. **21**: 1670–1676.

Jabbari, K., Cacciò, S., Païs De Barros, J.P., Desgrès, J., and Bernardi, G. (1997): Evolutionary changes in CpG and methylation levels in the genome of vertebrates. Gene **205**: 109–118.

Jablonka, E., Lachmann, M., and Lamb, M.J. (1992): Evidence, mechanisms and models for the inheritance of acquired characters. J. Theor. Biol. **158**: 245–268.

Jablonka, E., and Lamb, M.J. (2005): Evolution in Four Dimensions (London, England: MIT Press, Cambridge Massachusets).

Jackson, M., Krassowska, A., Gilbert, N., Chevassut, T., Forrester, L., Ansell, J., et al. (2004): Severe Global DNA Hypomethylation Blocks Differentiation and Induces Histone Hyperacetylation in Embryonic Stem Cells. Mol. Cell. Biol. **24**: 8862–8871.

Jaenisch, R., and Bird, A. (2003): Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat. Genet. **33**: 245–254.

Jiang, P.-P., Lang, Q.-L., Fang, S.-G., Ding, P., and Chen, L.-M. (2005): A genetic diversity comparison between captive individuals and wild individuals of Elliot's Pheasant (Syrmaticus ellioti) using mitochondrial DNA. J. Zhejiang Univ. Sci. B **6**: 413–7.

Joo, J. (2011): Metabolic regulation of Dna Methylation in Mammals (Elsevier Inc.).

Jorgensen, M.E., and Reilly, S.M. (2013): Phylogenetic patterns of skeletal morphometrics and pelvic traits in relation to locomotor mode in frogs. J. Evol. Biol. **26**: 929–43.

Jursch, T., Izsvák, Z., and Ivics, Z. (2013): Regulation of DNA transposition by CpG methylation and chromatin structure in human cells. Mob. DNA **4**: 15.

Katoh, M., Curk, T., Xu, Q., Zupan, B., Kuspa, A., and Shaulsky, G. (2006): Developmentally Regulated DNA Methylation in Dictyostelium discoideum Developmentally Regulated DNA Methylation in Dictyostelium discoideum †. **5**: 17–25.

Kazazian, H.H. (2004): Mobile elements: drivers of genome evolution. Science **303**: 1626–32.

Kellogg, R., and Kellogg, R. (1932): Mexican tailless amphibians in the United States National Museum. Bull. - United States Natl. Museum. **160**: 1–224.

Kiesecker, J.M. (2010): Global stressors and the global decline of amphibians: tipping the stress immunocompetency axis. Ecol. Res. **26**: 897–908.

Kinnard, T.B., and Westneat, D.F. (2009): Phenotypic and Genetic Variance of House Sparrows (Passer domesticus) Early in Development. Auk **126**: 884–895.

Klingenberg, C.P. (2011): MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. Mol. Ecol. Resour. **11**: 353–7.

Kostow, K.E. (2004): Differences in juvenile phenotypes and survival between hatchery stocks and a natural population provide evidence for modified selection due to captive breeding. Can. J. Fish. CORat. Sci. **61**: 577–589.

Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., and Maleszka, R. (2008): Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees via DNA Methylation. Science (80-.). **319**: 1827–1830.

Kundakovic, M., and Champagne, F.A. (2011): Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. Brain. Behav. Immun. **25**: 1084–1093.

Kunert, N., Marhold, J., Stanke, J., Stach, D., and Lyko, F. (2003): A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in Drosophila. Development **130**: 5083–5090.

Kuroda, A., Rauch, T.A., Todorov, I., Ku, H.T., Al-Abdullah, I.H., Kandeel, F., et al. (2009): Insulin Gene Expression Is Regulated by DNA Methylation. PLoS One **4**: e6953.

L. J. Shirose, R. J. Brooks, J. R. Barta, S.S.D. (1993): Intersexual differences in growth, mortality, and size at maturity in bullfrogs in central Ontario. Can. J. Zool. **71**: 2363–2369.

Laland, K.N. (2017): Schism and Synthesis at the Royal Society. Trends Ecol. Evol. **32**: 316–317.

Lane, N., Dean, W., Erhardt, S., Hajkova, P., Surani, A., Walter, J., et al. (2003): Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. Genesis **35**: 88–93.

Larson, P.M. (2002): Chondrocranial development in larval Rana sylvatica (Anura: Ranidae): Morphometric analysis of cranial allometry and ontogenetic shape change. J. Morphol. **252**: 131–144.

Larson, P.M. (2005): Ontogeny, phylogeny, and morphology in anuran larvae: morphometric analysis of cranial development and evolution in Rana tadpoles (Anura: Ranidae). J. Morphol. **264**: 34–52.

Laurila, A., Karttunen, S., and Merilä, J. (2002): Adaptive phenotypic plasticity and genetics of larval life histories in two Rana temporaria populations. Evolution **56**: 617–27.

Law, J. a, and Jacobsen, S.E. (2010): Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. Nat. Rev. Genet. **11**: 204–220.

Lemos-Espinal, J.A., and Smith, H.M. (Hobart M. (2007): Anfibios y reptiles del estado de Coahuila, México = Amphibians and reptiles of the state of Coiahuila, Mexico (Universidad Nacional Autónoma de México).

Lever, C. (2003): Naturalized reptiles and amphibians of the world (Oxford University Press).

Liebl, A.L., Schrey, A.W., Richards, C.L., and Martin, L.B. (2013): Patterns of DNA Methylation Throughout a Range Expansion of an Introduced Songbird. Integr. Comp. Biol. 1–8.

Lima, M.R., Macedo, R.H.F., Martins, T.L.F., Schrey, A.W., Martin, L.B., and Bensch, S. (2012): Genetic and morphometric divergence of an invasive bird: the introduced house sparrow (Passer domesticus) in Brazil. PLoS One **7**: e53332.

Lima, S.L., Sant ’ana Costa, C.L., Agostinho, C.Â., Andrade, D.R., and Pereira Filho, H.P. (1998): Estimativa do Tamanho da Primeira Maturação Sexual da Rã -Touro, Rana catesbeiana, no Sistema Anfigranja de Criação

Intensiva Estimate of Bullfrog Size at First Sexual Maturation, Rana catesbeiana, in the Intensive Growing Anfigranja System.

Long, J.L., and Agriculture Protection Board of Western Australia. (1981): Introduced birds of the world : the worldwide history, distribution, and influence of birds introduced to new environments (Universe Books).

Lu, S.C., and Mato, J.M. (2008): S-Adenosylmethionine in cell growth, apoptosis and liver cancer. J. Gastroenterol. Hepatol. **23 Suppl 1**: S73-7.

MacCracken, J.G., and Stebbings, J.L. (2012): Test of a Body Condition Index with Amphibians. J. Herpetol. **46**: 346–350.

Mager, J., Montgomery, N.D., Villena, F.P.-M. de, and Magnuson, T. (2003): Genome imprinting regulated by the mouse Polycomb group protein Eed. Nat. Genet. **33**: 502–7.

Manikkam, M., HCORe, M.M., Guerrero-Bosagna, C., Nilsson, E.E., and Skinner, M.K. (2014): Pesticide methoxychlor promotes the epigenetic transgenerational inheritance of adult-onset disease through the female germline. PLoS One **9**:.

Martin, L.B., Scheuerlein, A., and Wikelski, M. (2003): Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? Proc. Biol. Sci. **270**: 153–8.

Martínez, L., Jiménez, V., García-Sepúlveda, C., Ceballos, F., Delgado, J.M., Niño-Moreno, P., et al. (2011): Impact of early developmental arsenic exposure on promotor CpG-island methylation of genes involved in neuronal plasticity. Neurochem. Int. **58**: 574–581.

Massicotte, R., and Angers, B. (2012): General-purpose genotype or how epigenetics extend the flexibility of a genotype. Genet. Res. Int. **2012**: 317175.

Massicotte, R., Whitelaw, E., and Angers, B. (2011): DNA methylation: A source of random variation in natural populations. Epigenetics **6**: 421–427.

McGarrity, M.E., and Johnson, S. a. (2009): Geographic trend in sexual size dimorphism and body size of Osteopilus septentrionalis (Cuban treefrog): Implications for invasion of the southeastern United States. Biol. Invasions **11**: 1411–1420.

Meehan, R.R. (2003): DNA methylation in animal development. Semin. Cell Dev. Biol. **14**: 53–65.

Mendoza-Almeralla, C., Burrowes, P., and Parra-Olea, G. (2015): La quitridiomicosis en los anfibios de México: una revisión. Rev. Mex. Biodivers. **86**: 238–248.

Merila, J., Laurila, A., Laugen, A.T., Rasanen, K., and Pahkala, M. (1998): Plasticity in age and size at metamorphosis in *Rana temporaria* - comparison of high and low latitude populations. Ecography (COP.). **23**: 457–465.

Miaud, C., Guyétant, R., and Elmberg, J. (1999): Variations in life-history traits in the common frog Rana temporaria (Amphibia: Anura): a literature review and new data from the French Alps. J. Zool. **249**: 61–73.

Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky, H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. **16**: 1215–1215.

Moav R, Hulata G, Wohlfarth G. 1975. Genetic differences between the Chinese and European races of the common carp. *Heredity*;34(3):323-340.

Molloy, P.L. (1986): Effects of DNA methylation on specific transcription by RNA polymerase II in vitro. Mol. Biol. Rep. **11**: 13–7.

Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cardoso, M.C., and Leonhardt, H. (2005): Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **102**: 8905–9.

Narayan, E.J., and Gramapurohit, N.P. (2016): Sexual dimorphism in baseline urinary corticosterone metabolites and their association with body-condition indices in a peri-urban population of the common Asian toad (Duttaphrynus melanostictus). Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. **191**: 174–179.

Niculescu, M.D., and Zeisel, S.H. (2002): Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. J. Nutr. **132**: 2333S–2335S.

Nielsen HM, Ødegård J, Olesen I, Gjerde B, Ardo L, Jeney G, Jeney Z. 2010. Genetic analysis of common carp (Cyprinus carpio) strains: I. Genetic parameters and heterosis for growth traits and survival. *Aquaculture*;304(1-4):14-21.

Norouzitallab, P., Baruah, K., Vandegehuchte, M., Stappen, G. Van, Catania, F., Bussche, J. Vanden, et al. (2014a): Environmental heat stress induces epigenetic transgenerational inheritance of robustness in parthenogenetic Artemia model. FASEB J. **28**: 3552–63.

Norouzitallab, P., Baruah, K., Vandegehuchte, M., Stappen, G. Van, Catania, F., Bussche, J. Vanden, et al. (2014b): Environmental heat stress induces epigenetic transgenerational inheritance of robustness in parthenogenetic Artemia model. FASEB J. **28**: 3552–63.

Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., et al. (2000): Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. Curr. Biol. **10**: 475–8.

Otero, N.K.H., Thomas, J.D., Saski, C.A., Xia, X., and Kelly, S.J. (2012): Choline Supplementation and DNA Methylation in the Hippocampus and Prefrontal Cortex of Rats Exposed to Alcohol During Development. Alcohol. Clin. Exp. Res. **36**: 1701–1709.

Painter, R., Osmond, C., Gluckman, P., Hanson, M., Phillips, D., and Roseboom, T. (2008): Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol. **115**: 1243–1249.

Pearce, M.S., Mcconnell, J.C., Potter, C., Barrett, L.M., Parker, L., Mathers, J.C., et al. (2012): Global LINE-1 DNA methylation is associated with blood glycaemic and lipid profiles. Int. J. Epidemiol. **41**: 210–217.

Peig, J., Green, A.J., and Ame, C. (2009): New perspectives for estimating body condition from mass / length data : the scaled mass index as an alternative method. **118**: 1883–1891.

Ponger, L., and Li, W.-H. (2005): Evolutionary diversification of DNA methyltransferases in eukaryotic genomes. Mol. Biol. Evol. **22**: 1119–28.

Ponssa, M.L., and Candioti, M.F.V. (2012): Patterns of skull development in anurans: size and shape relationship during postmetamorphic cranial ontogeny in five species of the Leptodactylus fuscus Group (Anura: Leptodactylidae). Zoomorphology **131**: 349–362.

Pope, K.L., and Matthews, K.R. (2002): INFLUENCE OF ANURAN PREY ON THE CONDITION AND DISTRIBUTION OF RANA MUSCOSA IN THE SIERRA NEVADA. Herpetologica **58**: 354–363.

Prins, S. De, Koppen, G., Jacobs, G., Dons, E., Mieroop, E. Van de, Nelen, V., et al. (2013): Influence of ambient air pollution on global DNA methylation in healthy adults: A seasonal follow-up. Environ. Int. **59**: 418–424.

Reading, C.J., and Clarke, R.T. (1995): The effects of density, rainfall and environmental temperature on body condition and fecundity in the common toad, Bufo bufo. Oecologia **102**: 453–459.

Rechavi, O., Minevich, G., and Hobert, O. (2011a): Transgenerational Inheritance of an Acquired Small RNA-Based Antiviral Response in C. elegans. Cell **147**: 1248–1256.

Rechavi, O., Minevich, G., and Hobert, O. (2011b): Transgenerational inheritance of an acquired small RNA-based antiviral response in C. elegans. Cell **147**: 1248–56.

Reik, W., Dean, W., and Walter, J. (2001): Epigenetic reprogramming in mammalian development. Science (80-.). **293**: 1089–1093.

Reynoso (2009): DISTRIBUCIÓN Y ABUNDANCIA DE LA RANA TORO EN LOCALIDADES HISTÓRICAS: ¿ES LA RANA TORO UN VERDADERO INVASOR?. En preparación.

Rivas Sanchez, D.F., and Rivas Sanchez, D.F. (2015): Identifying potential for fisheries-induced evolution on behavioral traits of a Skagerrak cod (Gadus morhua) population.

Rocha, P.L., and Branco, L.G. (1998): Seasonal changes in the cardiovascular, respiratory and metabolic responses to temperature and hypoxia in the bullfrog Rana catesbeiana. J. Exp. Biol. **201**: 761–8.

Rohlf, F.J. (2015): The tps series of software. Hystrix, Ital. J. Mammal. **26**: 9–12.

Rosenmann, M., and Veloso, A. Valores hematológicos y distribution altitudinal de anfíbios chilenos. **84**: 79–84.

Rosso, A., and Castellano, S. (2004): Ecogeographic analysis of morphological and life-history variation in the Italian treefrog. 303–321.

Rountree, M.R., and Selker, E.U. (1997): DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in Neurospora crassa. Genes Dev. **11**: 2383–95.

Rusiecki, J.A., Baccarelli, A., Bollati, V., Tarantini, L., Moore, L.E., and Bonefeld-Jorgensen, E.C. (2008): Global DNA hypomethylation is associated with high serum-persistent organic pollutants in Greenlandic inuit. Environ. Health Perspect. **116**: 1547–1552.

Ruzov, A., Dunican, D.S., Prokhortchouk, A., Pennings, S., Stancheva, I., Prokhortchouk, E., et al. (2004): Kaiso is a genome-wide repressor of transcription that is essential for amphibian development. Development **131**: 6185–94.

Sakamoto, K., Onimaru, K., Munakata, K., Suda, N., Tamura, M., Ochi, H., et al. (2009): Heterochronic shift in Hox-mediated activation of sonic hedgehog leads to morphological changes during fin development. PLoS One **4**: e5121.

Salinas, S., and Munch, S.B. (2012): Thermal legacies: transgenerational effects of temperature on growth in a vertebrate. Ecol. Lett. **15**: 159–163.

Sch, C.S. (2004): Variation in body size and sexual dimorphism across geographical and environmental space in the frogs. Society 39–56.

Schaefer, M., Pollex, T., Hanna, K., Tuorto, F., Meusburger, M., Helm, M., et al. (2010): RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. Genes Dev. **24**: 1590–1595.

Schrey, A.W., Coon, C. a C., Grispo, M.T., Awad, M., Imboma, T., McCoy, E.D., et al. (2012): Epigenetic Variation May Compensate for Decreased Genetic Variation with Introductions: A Case Study Using House Sparrows (Passer domesticus) on Two Continents. Genet. Res. Int. **2012**: 979751.

SCHULTE-HOSTEDDE, A., and SCHANK, C. (2009): Secondary Sexual Traits and Individual Phenotype in Male Green Frogs (Rana clamitans). J. Herpetol. **43**: 89–95.

Schulte-Hostedde, A.I., Millar, J.S., and Hickling, G.J. (2001): Evaluating body condition in small mammals. Can. J. Zool. **79**: 1021–1029.

Seisenberger, S., Andrews, S., Krueger, F., Arand, J., Walter, J., Santos, F., et al. (2012): The Dynamics of Genome-wide DNA Methylation Reprogramming in Mouse Primordial Germ Cells. Mol. Cell **48**: 849–862.

Shafer, M.E.R., Willson, J. a, and Damjanovski, S. (2011): Expression analysis of the peroxiredoxin gene family during early development in Xenopus laevis. Gene Expr. Patterns **11**: 511–6.

Shipony, Z., Mukamel, Z., Cohen, N.M., Landan, G., Chomsky, E., Zeliger, S.R., et al. (2014): Dynamic and static maintenance of epigenetic memory in pluripotent and somatic cells. Nature **513**: 115–119.

Shirose, L.J., Brooks, R.J., Barta, J.R., and Desser, S.S. (1993): Intersexual differences in growth, mortality, and size at maturity in bullfrogs in central Ontario. Can. J. Zool. **71**: 2363–2369.

Shutler, D., and Marcogliese, D.J. (2011): Leukocyte Profiles of Northern Leopard Frogs, Lithobates pipiens, Exposed to Pesticides and Hematozoa in Agricultural Wetlands. COPeia **2011**: 301–307.

Skinner, M.K. (2011a): Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. Epigenetics **6**: 838–842.

Skinner, M.K. (2011b): Role of epigenetics in developmental biology and transgenerational inheritance. Birth Defects Res. C. Embryo Today **93**: 51–5.

Skinner, M.K. (2015): Environmental epigenetics and a unified theory of the molecular aspects of evolution: A neo-Lamarckian concept that facilitates neo-Darwinian evolution. Genome Biol. Evol. **7**: 1296–1302.

Smith, A.D., Kim, Y.-I., and Refsum, H. (2008): Is folic acid good for everyone? Am. J. Clin. Nutr. **87**: 517–33.

Snell-Rood, E.C., Troth, A., and Moczek, A.P. (2013): DNA Methylation as a Mechanism of Nutritional Plasticity: Limited Support From Horned Beetles. J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol. **320**: 22–34.

Somm, E., Stouder, C., and Paoloni-Giacobino, A. (2012): Effect of developmental dioxin exposure on methylation and expression of specific imprinted genes in mice. Reprod. Toxicol. **null**:

Songguang, X., Hongsheng, Y., Yi, Z., and Fusui, Z. (2004): Effects of body weight and water temperature on maximum food consumption of juvenileSebastodes fuscescens (Houttuyn). Chinese J. Oceanol. Limnol. **22**: 83–88.

Stancheva, I., El-Maarri, O., Walter, J., Niveleau, A., and Meehan, R.R. (2002): DNA methylation at promoter regions regulates the timing of gene activation in Xenopus laevis embryos. Dev. Biol. **243**: 155–65.

Stancheva, I., Hensey, C., and Meehan, R.R. (2001): Loss of the maintenance methyltransferase, xDnmt1, induces apoptosis in Xenopus embryos. **20**: 1963–1973.

Stein, A.D., Zybert, P.A., Bor, M. van de, and Lumey, L.H. (2004): Intrauterine famine exposure and body proportions at birth: the Dutch Hunger Winter. Int. J. Epidemiol. **33**: 831–836.

Stern, S., Fridmann-Sirkis, Y., Braun, E., and Soen, Y. (2012): Epigenetically Heritable Alteration of Fly Development in Response to Toxic Challenge. Cell Rep. 1–15.

Steyermark, A.C., Miamen, A.G., Feghahati, H.S., and Lewno, A.W. (2005): Physiological and morphological correlates of among-individual variation in standard metabolic rate in the leopard frog Rana pipiens. J. Exp. Biol. **208**: 1201–8.

Stouder, C., and Paoloni-Giacobino, A. (2010): Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the methylation pattern of imprinted genes in the mouse sperm. Reproduction **139**: 373–9.

Sullivan, K.E., Cutilli, J., Piliero, L.M., Ghavimi-Alagha, D., Starr, S.E., Campbell, D.E., et al. (2000): Measurement of cytokine secretion, intracellular protein expression, and mRNA in resting and stimulated peripheral blood mononuclear cells. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **7**: 920–4.

Sun, G., Fu, L., and Shi, Y.-B. (2014): Epigenetic regulation of thyroid hormone-induced adult intestinal stem cell development during anuran metamorphosis. Cell Biosci. **4**: 73.

Sztatecsny, M., Gallauner, A., Klotz, L., Baierl, A., and Schabetsberger, R. (2013): The Presence of Common Frogs (*Rana temporaria*) Increases the Body Condition of Syntopic Alpine Newts (*Ichthyosaura alpestris*) in Oligotrophic High-Altitude Ponds: Benefits of High-Energy Prey in a Low-Productivity Habitat. Ann. Zool. Fennici **50**: 209–215.

Sztatecsny, M., and Schabetsberger, R. (2005): Into thin air: vertical migration, body condition, and quality of terrestrial habitats of alpine common toads, *Bufo bufo*. Can. J. Zool. **83**: 788–796.

Tella, J.L., Lemus, J. a, Carrete, M., and Blanco, G. (2008): The PHA test reflects acquired T-cell mediated immunocompetence in birds. PLoS One **3**: e3295.

Tollefsbol, T.O. (2010): Handbook of epigenetics : the new molecular and medical genetics (Academic).

Torrens, C., Brawley, L., Anthony, F.W., Dance, C.S., Dunn, R., Jackson, A. a, et al. (2006): Folate supplementation during pregnancy improves offspring cardiovascular dysfunction induced by protein restriction. Hypertension **47**: 982–7.

Ulrich, C.M., Reed, M.C., and Nijhout, H.F. (2008): Modeling folate, one-carbon metabolism, and DNA methylation. Nutr. Rev. **66**: S27–S30.

Vanyushin, B.F., Mazin, A.L., Vasilyev, V.K., and Belozersky, A.N. (1973): The content of 5-methylcytosine in animal DNA: The species and tissue specificity. BBA Sect. Nucleic Acids Protein Synth. **299**: 397–403.

Vargas, A.O. (2009): Did Paul Kammerer discover epigenetic inheritance? A modern look at the controversial midwife toad experiments. J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol. **312**: 667–78.

Varriale, A. (2014): DNA Methylation, Epigenetics, and Evolution in Vertebrates: Facts and Challenges. Int. J. Evol. Biol. **2014**: 1–7.

Varriale, A., and Bernardi, G. (2006a): DNA methylation and body temperature in fishes. Gene **385**: 111–121.

Varriale, A., and Bernardi, G. (2006b): DNA methylation in reptiles. Gene **385**: 122–127.

Venegas, D., Marmolejo-Valencia, A., Valdes-Quezada, C., Govenzensky, T., Recillas-Targa, F., and Merchant-Larios, H. (2016): Dimorphic DNA methylation during temperature-dependent sex determination in the sea turtle Lepidochelys olivacea. Gen. Comp. Endocrinol. **236**: 35–41.

Vieira, K.S., Arzabe, C., Hernández, M.I.M., and Vieira, W.L.S. (2008): An examination of morphometric variations in a neotropical toad population (Proceratophrys cristiceps, Amphibia, Anura, Cycloramphidae). PLoS One **3**: e3934.

Vinkler, M., Bainová, H., and Albrecht, T. (2010): Functional analysis of the skin-swelling response to phytohaemagglutinin. Funct. Ecol. **24**: 1081–1086.

Walsh, C.P., Chaillet, J.R., and Bestor, T.H. (1998): Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. Nat. Genet. **20**: 116–7.

Wen-Hao Chou and Jun-Yi, and Lin Geographical Variations of Rana seuterl.

Xi, S., Zhu, H., Xu, H., Schmidtmann, A., Geiman, T.M., and Muegge, K. (2007): Lsh controls Hox gene silencing during development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **104**: 14366–71.

Xuan, L., Yiming, L., and McGarrity, M. (2009): Geographical variation in body size and sexual size dimorphism of introduced American bullfrogs in southwestern China. Biol. Invasions **12**: 2037–2047.

Yakushiji, N., Suzuki, M., Satoh, A., Sagai, T., Shiroishi, T., Kobayashi, H., et al. (2007): Correlation between Shh expression and DNA methylation status of the limb-specific Shh enhancer region during limb regeneration in amphibians. Dev. Biol. **312**: 171–182.

Yauk, C., Polyzos, A., Rowan-Carroll, A., Somers, C.M., Godschalk, R.W., Schooten, F.J. Van, et al. (2008): Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **105**: 605–10.

Yu, B.-G., Zheng, R.-Q., Zhang, Y., and Liu, C.-T. (2010): Geographic variation in body size and sexual size dimorphism in the giant spiny frog Paa spinosa (David, 1875) (Anura: Ranoidae). J. Nat. Hist. **44**: 1729–1741.

Zeh, D.W., Zeh, J. a, and Ishida, Y. (2009): Transposable elements and an epigenetic basis for punctuated equilibria. Bioessays **31**: 715–26.

Zhang, F.F., Cardarelli, R., Carroll, J., Fulda, K.G., Kaur, M., Gonzalez, K., et al. (2011a): Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood. Epigenetics **6**: 623–629.

Zhang, F.F., Cardarelli, R., Carroll, J., Zhang, S., Fulda, K.G., Gonzalez, K., et al. (2011b): Physical activity and global genomic DNA methylation in a cancer-free population. Epigenetics **6**: 293–299.

Zhang, G., Est?ve, P.-O., Chin, H., Terragni, J., Dai, N., Corr?a, I.R., et al. (2015): Small RNA-mediated DNA (cytosine-5) methyltransferase 1 inhibition leads to aberrant DNA methylation. Nucleic Acids Res. **43**: 6112–6124.

Zhang, X. (2011): Mechanisms of Dna Demethylation in Mammals (Elsevier Inc.).

Zhang, Y., Fatima, N., and Dufau, M.L. (2005): Coordinated Changes in DNA Methylation and Histone Modifications Regulate Silencing / Derepression of Luteinizing Hormone Receptor Gene Transcription Coordinated Changes in DNA Methylation and Histone Modifications Regulate Silencing / Derepression of Lut. Heal. (San Fr.

Zhou, F.C., Chen, Y., and Love, A. (2011): Cellular DNA methylation program during neurulation and its alteration by alcohol exposure. Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol. **91**: 703–715.

Zhu, Z.Z., Hou, L., Bollati, V., Tarantini, L., Marinelli, B., Cantone, L., et al. (2012): Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: A combined analysis. Int. J. Epidemiol. **41**: 126–139.

Zuk, M., Stoehr, A.M., Vogel, L.A., Bowden, R.M., Durando, M., Luque, E.H., et al. (2002): Using phytohaemagglutinin to determine immune responsiveness in saltwater crocodiles (Crocodylus porosus). Am. Nat. **160**: S9–S22.

(1999): Mean corpuscular volume (MCV) as a measure of condition in birds. Ecol. Lett. **2**: 352–356.

(2010): Association of Low-Dose Exposure to Persistent Organic Pollutants ...

(2013): Evolutionary synthesis. (Harvard Univ Press).

APÉNDICE 1

ASPECTOS MOLECULARES DE LA METILACIÓN DEL ADN

SOBRE LA NATURALEZA, Y FUNCIÓN DE LA METILACIÓN DEL ADN

La metilación del ADN ocurre en el carbón de la posición 5 de citosinas dentro del dinucleótido CpG, y es uno de los mecanismos más importantes de silenciamiento y regulación de la expresión genómica en vertebrados (Cheng and Roberts, 2001; Hendrich and Tweedie, 2003). Esta modificación bioquímica es reversible y el primer reporte de la existencia de 5-metilcitosina (5-mC) data de 1948 (American Society of Biological Chemists. et al.; Armstroong, 2013). Esta modificación se encuentra presente dentro del cuerpo de genes, en secuencias promotoras, en secuencias repetitivas y en elementos móviles (Bird, 2002). La gran mayoría de los dinucleótidos CpG dentro del genoma de muchos animales, se encuentra metilado. Sin embargo, existen regiones no metiladas o muy poco metiladas llamadas "islas CpG", las cuales se encuentran cerca o dentro de regiones promotoras de genes(Bird et al., 1985). Esto ocasiona que la metilación de ADN no sea homogénea a lo largo del genoma, y en vez de eso, ocurra en patrones específicos influenciados por la complejidad de elementos genómicos que son regulados por estas islas CpG (Bird, 2002).

Las enzimas encargadas de modificar citosinas son las ADN-metiltransferasas (AMTs o metilasas). En vertebrados hay cuatro de estas metilasas que se clasifican en tres familias diferentes. Las enzimas DNMT3a y DNMT3b metilan el ADN *de novo*, sin la necesidad de interactuar con grupos metilo preexistentes. La enzima DNMT1 por el contrario, requiere que haya metilación previa para poder funcionar y metilar la cadena complementaria de ADN (Mortusewicz et al., 2005; Chen and Li, 2006). Por último, la enzima DNMT2 metila ARN de transferencia y a la fecha no se han conocido con detalle sus funciones (Schaefer et al., 2010). Estas enzimas, incluyendo a las tres familias, llevan a cabo una reacción bioquímica en la cual un grupo metilo (CH3), es tomado de una molécula de s-adenosilmetionina (SAM) para incorporarlo al cabón 5 de una citosina. Esta reacción da lugar a una molécula de 5-metilcitosina y otra de s-adenosilhomocisteína (Hitchler and Domann, 2007). Por otro lado, la desmetilación puede ocurrir por una vía pasiva o por una vía activa que implica la participación de enzimas. En la pasiva, los grupos

metilo se pierden paulatinamente con cada ronda de división celular en donde no actúa la DNMT1, y no se metila la cadena complementaria (Inoue et al., 2011). En la vía activa, la enzima TET1/2/3 hidroxilasa, convierte la 5-metilcitosina en 5-hidroximetilcitosina (5-hmC). Posteriormente, la 5-hmC puede ser desmetilada y convertida en 5-carboxilcitosina (5-caC) por la misma enzima. La 5-hmC también es convertida 5-metiluracilo (5-mU) o en timina por la citidin desamninasa AID. Finalmente, tanto la timina, como la 5-caC y 5-mU se convierten en citidina por la enzima timina glicosilasa (TDG)(Bhutani et al., 2011). Es muy importante resaltar que si bien la 5-hmC, es una forma intermedia entre la citosina y la 5-mC, también comienzan a encontrarse importantes funciones en la regulación de la expresión genética y en el desarrollo de vertebrados (Guo et al., 2011). Por último, de manera natural también ocurre la metilación de adenina y timina. Sin embargo, sus implicaciones biológicas aún no son totalmente comprendidas (Kunert et al., 2003).

Los grupos metilo que se usan como sustrato para la metilación del ADN (ya sea de novo o de mantenimiento), provienen únicamente de la dieta de animales y su disponibilidad está asociada a diversas enzimas y cofactores (Joo, 2011). La SAM, es la molécula donadora de metilos "universal" en todas las células. Los folatos por su parte, son los principales compuestos, a partir de los cuales se sintetiza SAM. Junto con colina y otros cofactores del grupo de la vitamina B, los folatos son los principales mediadores del metabolismo de un carbón. En la circulación, el folato se encuentra en la forma de metil-tetrahidrofolato (metil-THF). Dentro de la célula, el metil-THF es convertido a tetrahidrofolato (THF). Después, la metionina sintasa, genera metionina a partir de homocisteína (que viene de otra ruta metabólica) y THF; esta reacción necesita de vitamina B12 como cofactor para llevarse a cabo. La metionina es finalmente activada como SAM, por la acción de la metionina adenosiltransferasa (Smith et al., 2008; Ulrich et al., 2008). La SAM es una molécula precursora esencial, y es segunda en importancia, sólo detrás del ATP, por la cantidad de reacciones diferentes en las que participa. La SAM no sólo se usa en la metilación de ADN, también se usa en la síntesis de ácidos nucleicos, en la metilación de muchas proteínas, así como en la síntesis de glutatión (por la vía de transulfonación). Además, se cree que de manera independiente a su función como donadora de grupos metilo, participa en el crecimiento celular, apoptosis, diferenciación celular y otros más (Lu and Mato, 2008). La dieta y muchos procesos metabólicos, afectan de manera directa la metilación de ADN. El ejemplo más ilustrativo es la complementación de la dieta con ácido fólico, misma que brinda beneficios al mantener óptimos los niveles de metilación dentro de las células (Torrens et al., 2006). Por otro lado, el estado redox es uno de los factores metabólicos más importantes que regulan la metilación del ADN.

Moléculas intermediarias como el NAD+, la SAH y 2-oxoglutarato afectan de manera directa la actividad de las enzimas DNMTs, y dado que el estado redox genera fluctuaciones en éstos, la metilación del ADN tiene una conexión directa con el metabolismo central y el balance energético celular (Hitchler and Domann, 2007; Cyr and Domann, 2011).

La función de la MET en las células

El control de la expresión génica se lleva a cabo por la activación o represión de la transcripción. La metilación de ADN puede participar en este proceso a través de tres formas: 1) inhibiendo la actividad de la RNA polimerasa (Molloy, 1986) y regulando la afinidad que tiene el complejo de iniciación de la transcripción por regiones promotoras, 2) regula el reclutamiento/actividad de factores de transcripción (American Society of Biological Chemists. et al.), y 3) modifica la accesibilidad que tienen diversos complejos regulatorios a la secuencia del ADN (Bogdanović and Veenstra, 2009). De estos tres procesos, el último es el más estudiado y más importante y es a través de modular la compactación-relajación de la cromatina que dicha accesibilidad cambia. Los grupos metilo en el ADN interactúan de manera especial con histonas, las proteínas que conforman los nucleosomas, unidad básica de la estructura de la cromatina (Zhang et al., 2005). Estas proteínas pueden contener una o muchas modificaciones postraduccionales que cambian su estructura y con ello la accesibilidad del ADN (revisado en Bogdanović and Veenstra, 2009). En este sentido, los grupos metilo y las AMTs interactúan con las enzimas que modifican a las histonas, formando complejos de regulación en determinados sitios (Fuks et al., 2003). Por otro lado, la metilación del ADN también participa en el complejo proceso de represión de la transcripción mediado por RNAs no codificantes. Se sabe por ejemplo, que la enzima DNMT1 interactúa directamente con moléculas de RNA pequeñas no-codificantes(RNAnc) (Zhang et al., 2015).

La metilación del ADN interactúa con diversas señales y vías de señalización que permiten tener un control preciso de la expresión génica. Un ejemplo de ello es la participación conjunta del complejo polycomb y la metilación del ADN en la respuesta de señalización de genes Hox, importantes para el desarrollo de animales(Xi et al., 2007). En este sentido, se ha visto que un aumento en la metilación del gen *Sonic Hedgehog* (*Shh*), promueve su inactivación y a su vez de todos los genes cascada abajo de éste importante

gen homeótico(Yakushiji et al., 2007). Por otro lado, la metilación de la secuencia promotora del elemento de respuesta a cAMP (CRE), inhibe la expresión del gen de la insulina(Kuroda et al., 2009).

La diferenciación celular se logra por el establecimiento y mantenimiento de un epigenoma en particular en cada linea celular y tejido. La metilación del ADN es un componente ubicuo en el genoma de animales, y ayuda a mantener un fenotipo celular estable a lo largo de varios ciclos de división celular. Este proceso mejor conocido como memoria celular, depende de patrones de expresión génica particular a cada linaje celular (Shipony et al., 2014). La enzima DNMT1, es responsable de mantener dichos patrones, ya que actúa sobre moléculas de ADN que se encuentran hemimetiladas. Durante la replicación del genoma, cada nueva secuencia complementaria de ADN se encuentra "desnuda" de grupos metilo. Como la cadena de ADN que sirve como molde conserva sus grupos metilo, la DNMT1 reconoce éstos y metila la nueva secuencia complementaria (Hermann et al., 2004). Las enzimas que modifican el estado de la cromatina también participan en este proceso a través de la modificación postraduccional de DNMT1 Por ejemplo, la proteína LSD1 (desmetilasa lisina-específica) metila a DNMT1, afectando su estabilidad y actividad sobre el ADN. Por otro lado, la ausencia de las enzimas DNMTs, inhibe por completo la diferenciación de las células embironarias troncales (CET), a partir de las cuales cada linaje celular se forma. Una disminución significativa de niveles globales de metilación, impide que se silencien factores de pluripotencia en estas células (Jackson et al., 2004). La diferenciación de las células germinales primordiales (CGP) es un ejemplo importante de la participación de la metilación del ADN en la diferenciación celular. Las CGP atraviesan un proceso de reprogramación epigenética de las marcas de metilación de ADN; esto es, se desmetila la mayor cantidad de secuencias y luego se vuelven a metilar (De Felici, 2011). Durante su migración hacia las gónadas, ocurre una pérdida casi "total" de la metilación. En mamíferos, sólo las secuencias improntadas, islas CpG en el cromosoma X y específicas de la línea germinal , permanecen metiladas hasta que entran en contacto con las gónadas. A partir de este momento, todos los patrones de metilación se vuelven a restaurar, pero también nuevas marcas de metilación se incorporan al genoma(Seisenberger et al., 2012).

LA FUNCIÓN DE LA MET EN EL DESARROLLO DEL FENOTIPO

Más del 70% del genoma de vertebrados se encuentra metilado. Sin embargo, a lo largo del desarrollo, emergen muchos, diferentes y dinámicos patrones de metilación en células somáticas y germinales que dan lugar al fenotipo adulto (Meehan, 2003). En ratones, justo después de la fertilización, se observa que el pronúcleo paterno se desmetila considerablemente en genes improntados. Por el contrario, el material genético de la madre, mantiene su estado de metilación, y hasta la 8ª ronda de división celular disminuye a niveles similares que el genoma paterno. Este tipo de reprogramación también se observa en ratas, bovinos y en puercos(Reik et al., 2001). En este primer evento de desmetilación, se desmetilan tanto secuencias repetitivas, satélites, elementos móviles, genes caseros (o constitutivos), y tejido específicos (Oswald et al., 2000). Después de estas dos rondas de desmetilación, ocurre una ola general de metilación *de novo* durante la etapa de morula. Ocurre en muchos sitios genómicos distintos a excepción de las islas de CpG, en donde hay una densidad alta de dinucleótidos CpG pero muy poca metilación (Lane et al., 2003). En esta etapa, los genomas del padre y madre tienen el mismo nivel de metilación, e incrementan de igual manera hacia la etapa de blastocisto (Haaf, 2006). En anfibios, el genoma se halla metilado durante las primeras etapas embrionarias, pero hacia el final de la etapa de blástula disminuye un 40%, para volver a aumentar al final de gastrula. Esto ocurre en regiones promotoras de genes. Por el contrario, en ningún momento se observa que las secuencias repetitivas o transponibles(Stancheva et al., 2002). De manera interesante, durante las etapas de blástula y gástrula, se expresan genes que se encuentran altamente metilados en la rana *Xenopus laevis*. Esto se debe a que las regiones promotoras y también los cuerpos completos de muchos genes se encuentran metilados durante la etapa de blástula y gastrula, pero se encuentra ausente en los sitios de inicio de la transcripción, donde abundan histonas H3 con una trimetilación en su lisina 4. Este hallazgo es importante ya que muestra la compleja interacción entre la metilación del ADN y la modificación de las histonas para la correcta expresión del genoma(Bogdanovic et al., 2011). La metilación del ADN también es crucial en estadios más tardíos del desarrollo, como en la neurulación. Se sabe que la metilación de ADN, así como la expresión de DNMT1, la proteína Methyl-binding domain 1 (MBD1), siguen patrones espaciotemporales específicos que coinciden con la diferenciación del tubo neural (Zhou et al., 2011). Durante el desarrollo del tubo neural en el eje antero-posterior, el tallo cerebral se desarrolla primero; de ahí continua de manera rostral y caudal, al igual que la emergencia de patrones específicos de metilación. Por otro lado, el tubo neural se expande por la proliferación de células neuroprogenitoras que cuentan con niveles muy bajos de metilación de ADN (Zhou et al., 2011). En cuanto al desarrollo tardío, se sabe que la metilación del ADN, es indispensable para que ocurra la metamorfosis en anfibios(Sun et al., 2014) y lampreas(Covelo-Soto et

al., 2015), así como para que el proceso de regeneración de miembros(Yakushiji et al., 2007).