

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Caracterización del mecanismo de eclosión y la eclosión por estímulo en

Hyloxalus nexipus y *Epipedobates tricolor* (Dendrobatidae)

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias
Biológicas

DANIELA EMILIA ZURITA PAREDES

Quito, 2020

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Srta. Daniela Emilia Zurita Paredes ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Andrés Romero Carvajal

Director de la Disertación

Quito, 21 de abril del 2020

A mi madre Mónica

A mi padre Mauricio

A mi hermano Mauricio Alejandro

Y a todas aquellas personas que hacen cada día de mi vida especial.

Caracterización del mecanismo de eclosión y la eclosión por estímulo en *Hyloxalus nexipus* y *Epipedobates tricolor* (Dendrobatidae)

Characterization of the hatching mechanism and stimulus hatching in *Hyloxalus nexipus* y *Epipedobates tricolor* (Dendrobatidae)

Autores: Daniela Zurita Paredes^{1*} y Andrés Romero Carvajal^{1**}

¹Escuela de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

*daniela.emilia96@gmail.com

**maromero@puce.edu.ec

RESUMEN

Las estrategias reproductivas de las ranas son diversas y complejas, sin embargo, las glándulas (HGC) y enzima de eclosión (HE) son un mecanismo compartido por varios anuros que eclosionan siendo renacuajos. La enzima permite que las capas de protección del huevo sean digeridas facilitando la eclosión. Al ser un grupo diverso, aún falta mucho por conocer sobre las glándulas de eclosión, su morfología, distribución y funcionamiento. A través de inmunohistoquímica y microscopía electrónica de barrido (SEM) se encontró la presencia de HGC y HE en estadios cercanos a la eclosión (23, 24 y 25) en las especies *Hyloxalus nexipus* y *Epipedobates tricolor* (Dendrobatidae). Se observaron diferencias en la distribución y morfología de las HGC en los diferentes estadios de desarrollo entre las dos especies. La presencia de HGC, la detección de HE en embriones eclosionados y la formación de varias burbujas de eclosión muestran que la enzima no es liberada en un solo momento, sino que puede ser retenida, similar a otras especies de desarrollo rápido como *Agalychnis callidryas*. Al recibir un estímulo mecánico, los embriones de dendrobátidos son capaces de eclosionar únicamente en estadio 24 y 25, por lo que la eclosión adaptativa puede estar ausente o retrasada en comparación a *Agalychnis callidryas*. Se propone que esto ocurre debido al cuidado parental.

PALABRAS CLAVE: Anura, cuidado parental, eclosión ecológica, enzima de eclosión, glándulas de eclosión.

ABSTRACT

Frogs' reproductive strategies are diverse and complex, but hatching gland cells (HGC) and hatching enzyme (HE) are a common mechanism in Anurans that hatch as tadpoles. The HE digests the egg layers facilitating hatching. Despite being a diverse group, there is still much we don't know regarding their morphology, distribution, and function. Through immunostaining and electron microscopy, we detected HGC and HE at stages near hatching (23, 24 and 25) in *Hyloxalus nexipus* and *Epipedobates tricolor* (Dendrobatidae). Diversity in distribution and morphology of the HGC was observed in different stages of development between the two species. Presence of HGC, detection of HE in hatchlings, and the formation of several hatching blebs show us that embryos don't liberate HE at once, and is retained in the glands, like in other fast-developing species such as *Agalychnis callidryas*. Dendrobatid tadpoles only hatch in late developmental stages (24 and 25) after mechanical stimulation, hence environmentally cued hatching may be absent or delayed in this species due to parental care.

KEYWORDS: Anura, environmentally cued hatching, hatching enzyme, hatching gland cells, parental care.

INTRODUCCIÓN

La eclosión es un proceso crítico para los organismos ovíparos, ya que dictamina el cambio de una fase embriónica a una larval y una diferencia en las condiciones ambientales que los rodea (Martin, 1999; Warkentin, 1995). El periodo de tiempo en el que ocurre la eclosión es diferente para cada organismo, sin embargo, factores bióticos (patógenos y predadores) y abióticos (señales ambientales) pueden inducir variaciones en el tiempo de eclosión y adaptaciones diferentes para cada clado (Cohen, Piacentino y Warkentin, 2018a; Cohen, Seid y Warkentin, 2016; Martin, 1999; Touchon, Gomez-Mestre y Warkentin, 2006; Warkentin, 1995; Warkentin, 2011a).

En el orden Anura existe una gran diversidad de estrategias reproductivas tanto en el tamaño, estructura y masa de los huevos, lugares donde son depositados, cuidado parental y el avance del desarrollo antes de la eclosión (Altig y McDiarmid, 1999; Salthe, 1963; Wells, 2010). A pesar de ser un orden muy diverso, todos los embriones de anuros están rodeados por una capa gelatinosa y una membrana vitelina, por lo que los mecanismos de eclosión deberían ser similares (Cohen et al., 2018a; Salthe, 1963).

Los anuros que eclosionan siendo renacuajos comparten el proceso de eclosión. Este es un proceso químico que involucra una enzima proteolítica (enzima de eclosión o HE) secretada por glándulas de eclosión (HGC), que es capaz de digerir las capas del huevo permitiendo la eclosión (Altig y McDiarmid, 1999; Cohen, Piacentino y Warkentin, 2018b; Yoshizaki y Katagiri, 1975).

La mayoría de estudios realizados sobre glándulas de eclosión (HGC) han sido realizados en especies con huevos colocados en cuerpos de agua (Carroll y Hedrick, 1974; Cohen et al.,

2018a; Downie et al., 2013; Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007; Yamasaki, Katagiri y Yoshizaki, 1990; Yoshizaki, 1973, 1978; Yoshizaki y Katagiri, 1975) y muy pocos en huevos terrestres (Cohen, 2017; Delia, Ramírez-Bautista y Summers, 2014; Nokhbatolfoghahai, Pollock y Downie, 2014).

En *Xenopus laevis* (huevos colocados en cuerpos de agua), las glándulas de eclosión aparecen en etapas tempranas del desarrollo permitiendo que los embriones eclosionen sin estar completamente desarrollados y terminen su desarrollo fuera de las capas del huevo (Nieuwkoop y Faber, 1994). El proceso de eclosión ocurre en 2 etapas (st 20-34). Las HGC aparecen en la epidermis del estadio 20, la actividad de la HE comienza desde el estadio 24 y la liberación es progresiva hasta la eclosión (st 29/30, yema de la cola) (Carroll y Hedrick, 1974; Cohen, 2017; Nieuwkoop y Faber, 1994; Yoshizaki, 1973). Así mismo, en *Rana japonica* (Yoshizaki, 1978), *Rana chensinensis* (Yoshizaki y Katagiri, 1975) y *Bufo japonicus* (Yamasaki et al., 1990) también se ha observado que la liberación de enzima y la digestión de las membranas del huevo ocurre de forma gradual desde estadios tempranos del desarrollo.

Por otro lado, en estudios más recientes se ha encontrado que en *Agalychnis callidryas* (huevos colocados en vegetación sobre cuerpos de agua) existen 2 tipos de glándulas de eclosión: las HGC tempranas y las HGC tardías. Estos dos tipos de glándulas se presentan a lo largo de varios estadios del desarrollo y se sobrelapan muy poco tiempo, por lo que se sugiere que ambas permiten la eclosión del embrión en distintas etapas del desarrollo al estar sometido a diferentes presiones (Cohen et al., 2018b).

La distribución de las glándulas de eclosión (HGC), en la mayoría de los casos es en la cabeza y en algunos casos se puede extender a lo largo de la línea media dorsal del tronco (Cohen, 2017; M. Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007). Nokhbatolfoghahai y Downie (2007) al

comparar 6 familias de anuros (Bufonidae (4 especies), Pipidae (1), Hylidae (8), Leptodactylidae (5), Microhylidae (1) y Ranidae (1)) encontraron que 20 de las 21 especies estudiadas presentaron glándulas de eclosión, cuya forma y patrón de HGC fue similar en la zona dorso-frontal de la cabeza con una forma de T (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007). Estudios posteriores de *Phyllomedusa trinitatis* (única especie carente de HGC según Nokhbatolfoghahai y Downie (2007)) demostraron la presencia de glándulas de eclosión en la zona latero-dorsal de la cabeza en estadio 25 (Downie et al., 2013). Debido a las abundantes estrategias reproductivas de las ranas y su gran diversidad aún falta mucho por conocer sobre las glándulas de eclosión, su morfología, distribución y funcionamiento.

Dentro de Anura, los Dendrobátidos poseen una estrategia reproductiva diferente a la de otras ranas, el cuidado parental. Los padres protegen los huevos colocados en nidos terrestres en la hojarasca durante todo su desarrollo embrionario. Cuando los embriones eclosionan, los padres movilizan a los renacuajos hasta el agua donde continúa la etapa de metamorfosis (Contreras Cisneros, 2015; Savage, 2002; Wells, 2010; Weygoldt, 1987). Se ha estimado que en esta familia, la eclosión ocurre en el estadio 25, aproximadamente 7 días después de la ovoposición (Hervas, Torres, Montenegro-Larrea y Del Pino, 2015; Nokhbatolfoghahai et al., 2014). En la especie *Ranitomeya imitator* se ha observado que los padres usan sus patas traseras para manipular los huevos y causar la eclosión, sin embargo, aún no es claro si los padres rompen el huevo, estimulan la eclosión u ocurren ambas estrategias simultáneamente (Brown, Twomey, Summers y Morales, 2008; Warkentin, 2011b).

Aun cuando las investigaciones sobre la enzima de eclosión, las glándulas de eclosión, su morfología, distribución y funcionamiento han sido numerosas y de gran impacto, aún falta mucho por estudiar del orden Anura, especialmente sobre ranas con estrategias reproductivas

diferentes como los Dendrobátidos. A pesar de los diferentes estudios sobre este tipo de estrategia reproductiva, no se conoce sobre el mecanismo de eclosión de los embriones y posibles adaptaciones que posean. En este estudio se quiere examinar la presencia de glándulas de eclosión (HGC), enzima de eclosión (HE), su distribución y morfología en *Hyloxalus nexipus* y *Epipedobates tricolor* (Dendrobatidae) a través de inmunodetección y microscopía electrónica de barrido (SEM). También se realizaron videos de eclosión por estímulo para detectar si existe una adaptación para una eclosión rápida como se ha visto en *Agalychnis callidryas* (Cohen et al., 2016).

METODOLOGÍA

Obtención y cuidado de Embriones. - Las posturas de ranas utilizadas fueron obtenidas de la Iniciativa de Conservación “Balsa de los Sapos” de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Para mantener condiciones estables y evitar la desecación de los embriones, se colocó a las posturas en cajas Petri con papel absorbente humedecidos con agua filtrada y plástico.

Fijación de Embriones. - Se fijaron embriones de Dendrobátidos (*Hyloxalus nexipus* y *Epipedobates tricolor*) en estadio 23, 24 y 25 según las tablas de desarrollo de del Pino y colaboradores (2004) y Hervas y colaboradores (2015). Se retiró la gelatina y la membrana vitelina del huevo en una caja Petri colocada sobre hielo para evitar movimiento del embrión. Inmediatamente se trasladó el embrión decapsulado a otra caja Petri con agua filtrada reposada a temperatura ambiente durante unos minutos. Después se pasó el embrión a una caja Petri con agua filtrada fría (4 °C) durante pocos segundos hasta no notar movimiento. El embrión se colocó en un tubo de microcentrífuga con Paraformaldehído 4 % a 4 °C para fijarlo y

permaneció en este 48 horas a 4 °C. Finalmente, se cambió de forma gradual a Metanol 100 % (25 %, 50 %, 75 % y 100 %) y se almacenó a -20 °C hasta realizar la inmunodetección.

Inmunotinción. - Los embriones almacenados en Metanol al 100% fueron rehidratados con PBS 1X gradualmente (10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % y 100 %), cada lavado duró 5 minutos. Además, se realizaron 4 lavados de PBS 1X (Brivanlou y Harland, 1989) durante 5 minutos cada uno.

Se cambió a solución de PBS-Tr para permeabilizar los embriones y se mantuvo en movimiento constante durante 20 minutos. Adicionalmente se hicieron 4 lavados de 5 minutos y 2 de 10 minutos con la misma solución y en movimiento a temperatura ambiente.

Después se colocó en solución de bloqueo (Brivanlou y Harland, 1989) durante 1 hora en movimiento a temperatura ambiente para bloquear los sitios de unión inespecífica y finalmente se puso el anticuerpo primario de Hatching Enzyme (AcHE: Rabbit Polyclonal Antibody Development, propiedad de Karen Warkentin) diluido en solución de bloqueo a una concentración de 1:500; se agitó repetitivamente los tubos durante 4 horas a temperatura ambiente y se dejó a 4 °C durante 48 horas.

Pasadas las 48 horas, se realizaron 4 lavados de 5 minutos cada uno con solución de PBS-Tr. A partir de este paso se realizó todo en oscuridad. Se colocó anticuerpo secundario anti-rabbit IgG (SIGMA, Lot:16C0919) diluido en solución de bloqueo a concentración 1:500 (2 horas a temperatura ambiente en movimiento y 24 horas a 4 °C).

En oscuridad, se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS 1X y se colocó DAPI disuelto en PBS 1X (0,1ul en 1ul) durante 2 horas a temperatura ambiente en movimiento. Finalmente, se

hicieron 2 lavados de 10 minutos cada uno con PBS 1X en movimiento y se posfijó en Formaldehído 4 % en PBS 1X.

Para la observación de la inmunotinción, los embriones fueron colocados en placas cóncavas con Formaldehído 4 % en PBS 1X con cubreobjetos. Los embriones fueron examinados desde una vista dorsal y frontal. Para ver la parte frontal de los embriones, se los diseccionó por la mitad y se los montó en las placas. Las inmunodetecciones fueron observadas en un microscopio Nikon Eclipse Ni y fotografiadas con la cámara MshotMs60 usando el programa Mshot Image Analysis System (Guangzhou Micro-shot Technology, 2014).

Microscopia Electrónica (SEM). –Los embriones usados para microscopia electrónica fueron fijados de la misma forma que los usados para inmunodetección, usando el fijativo Glutaraldehído 5 % + Paraformaldehído 2 % en PBS 1X.

La metodología utilizada se basó en el protocolo descrito por Guerra y Debut (2012) y fue realizado en la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE). Los embriones fueron deshidratados con Etanol 100 % en concentraciones crecientes de 30 %, 50 %, 50 %, 90 %, 100 % y 100 %, cada lavado duró 20 minutos; los embriones fueron almacenados a 4 °C durante 3 días antes de ser transportados a la ESPE. A continuación, las muestras fueron liofilizadas a -62 °C y a 1.2 Pa por 48 horas. La fijación de los embriones fue sobre un porta-muestras para microscopía electrónica de barrido con ayuda de una cinta de carbono doble faz y pinzas de disección. Los embriones fueron colocados en la cinta ventralmente para que quede expuesto el dorso y también fueron diseccionados por la mitad para colocarlos con la cabeza hacia arriba. Los portamuestras fueron introducidos en el Evaporizador de oro Sputter Coating Quorum Q105R, donde fueron recubiertas con una capa de oro de 20 nm de espesor bajo las siguientes

condiciones: 15 mA y 80 m Torr por 90 segundos. Finalmente fueron observadas en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) marca TESCAN modelo MIRA 3.

Videos de eclosión. - Se realizaron videos de la eclosión por estimulación de embriones de *Hyloxalus nexipus* y *Epipedobates tricolor* en estadios 23, 24 y 25 basado en el protocolo de Cohen, Seid y Warkentin (2016). Se colocó un embrión cuidadosamente en una caja Petri plástica con unas gotas de agua filtrada a temperatura ambiente, se dejó aclimatar al embrión por aproximadamente 2 minutos y se puso bajo el estereomicroscopio Olympus SZX16 y se filmó con el programa Cell Sense Estandar (Olympus Corporation, 2020). Iniciado el video se tomó una herramienta metálica sin punta (cánula) e inmediatamente se realizó el estímulo de agitación al embrión; el estímulo fue realizado aproximadamente cada 25 segundos (rango 10 - 50 segundos) hasta que el embrión eclosione. El máximo de tiempo esperado y filmado fue de 1 hora 30 minutos. Se realizaron 10 videos por cada estadio por cada especie, en donde se observó movimiento de los embriones, formación de burbuja de eclosión, eclosión y duración. Para visualizar las diferencias en el tiempo de eclosión de cada especie y cada estadio se realizó un boxplot en R Studio con cada uno de los tiempos de los videos.

RESULTADOS

Glándulas de eclosión en *Epipedobates tricolor* e *Hyloxalus nexipus*

Se identificaron glándulas de eclosión (HGC) tanto en *Epipedobates tricolor* como en *Hyloxalus nexipus* en estadios cercanos a la eclosión por inmunohistoquímica y microscopía electrónica (SEM). Los estadios en donde se encontró mayor presencia de glándulas fueron 24

y 25, mientras que en 23 fue muy baja. Las HGC poseen microvilli cortos y están rodeadas por células epiteliales. Estas difieren en morfología y distribución entre las dos especies.

En estadio 23, muy pocas células se marcaron con el anticuerpo para HE en ambas especies, tanto en la zona frontal (*E. tricolor* Figura 1A-1C; *H. nexipus* Figura 3A-3C) como en la dorsal (*E. tricolor* Figura 2A-2C; *H. nexipus* Figura 4A-4C). Hay diferentes tipos de glándulas de eclosión en la parte dorsal como frontal de *E. tricolor* y están distribuidas desde la mitad del embrión hasta la parte anterior de la cabeza (Figura 1D, 1E y Figura 2D-2F). En *H. nexipus*, las HGC se encuentran únicamente en la zona frontal del embrión, tienen una forma redondeada y con microvilli corto (Figura 3D-3F y 4D-4F).

En estadio 24 y 25 se ve un aumento en el número de glándulas de eclosión, la expresión ocurre en zonas específicas y en células bien marcadas. En *Epipedobates tricolor* (st24), se ven HGC en la zona anterior de la cabeza (Figura 1F-1H) y cerca de los ojos. Al observar por microscopía electrónica se encontraron diferentes morfologías de las glándulas y estas estaban dispersas a lo largo de la cara del embrión (Figura 1I-1J). Desde una vista dorsal, las glándulas se ven en parches en la parte posterior a los ojos y poseen una forma poligonal (Figura 2G-2L). En algunos casos se pudo observar parches hasta el inicio de la cola.

En estadio 25 de *E. tricolor*, las HGC se acumulan alrededor de las narinas y en el centro del hocico desde una vista frontal; se encuentran juntas y rodeadas de células epiteliales (Figura 1K-1O). En la zona dorsal, por inmunodetección y SEM se observa que las HGC están ubicadas desde la parte anterior de los ojos hasta la mitad del embrión formando parches (Figura 2M-2R).

En embriones eclosionados, pocas células se marcan y estas se encuentran dispersas por diferentes zonas (Figura 1P-1R y 2S-2U). Las áreas donde se ubicaban HGC, hay células hundidas (zona frontal; Figura 1S, 1T) o pequeños agujeros (zona dorsal; Figura 2V-2X); en algunos casos se encontraron HGC intactas.

En comparación, *H. nexipus* mostró mayor cantidad de HGC en la zona frontal. La detección del anticuerpo para HE, en estadio 24 marcó células cercanas a las narinas, hocico y ojos rodeadas de células epiteliales (Figura 3G-3I y 4G-4I). Por microscopía electrónica, las HGC se ven poligonales, redondeadas, cercanas unas de otras y ubicadas en su mayoría por las narinas (Figura 3J-3L).

En estadio 25, las glándulas de eclosión se encuentran agrupadas desde los ojos hasta la parte más inferior de la cara (Figura 3M). Al realizar un acercamiento se puede observar que existen grandes concentraciones de células marcadas en la zona frontal entre las narinas (Figura 3N-3O). Las HGC están apegadas entre sí con pocas células epiteliales a su alrededor, poseen una forma redondeada y con relieve (Figura 3P-3R). Mientras que en la zona dorsal se encuentra HGC más dispersas (Figura 4M-4O) y con morfología diferente (Figura 4P-4R).

A diferencia de *E. tricolor*, en los embriones eclosionados de *H. nexipus* hay casi nula expresión del anticuerpo en zona frontal (Figura 3S-3U) y zona dorsal (Figura 4S-4U). Sin embargo, también hay la presencia de agujeros o perforaciones en las zonas donde se ubicaban las HGC (Figura 3V-3X y 4V-4X). En la vista frontal se encontraron pocas glándulas después de la eclosión (Figura 3X).

La eclosión por estímulo en embriones de *Epipedobates tricolor* e *Hyloxalus nexipus*

Los videos de eclosión por estímulo muestran que ambas especies, *Epipedobates tricolor* e *Hyloxalus nexipus*, no eclosionan en estadio 23, pero en estadio 24 y 25 sí logran romper las capas del huevo. También se observa diferentes comportamientos de los embriones dentro del huevo; los embriones de ambas especies, al recibir un estímulo mecánico reaccionan. Se observan movimientos de agitación, acercamiento a la membrana vitelina, formación de una ampolla, ruptura de la membrana y finalmente la eclosión del huevo. La eclosión ocurrió en diferentes periodos de tiempo dependiendo del estadio y de la especie. En algunos casos se observó la formación de más de una burbuja de eclosión, en estadios 24 y 25 de ambas especies.

En *Epipedobates tricolor*, en estadio 23 no se observa eclosión después de 60 minutos de grabación, en algunos casos se extendió los videos hasta 1 hora 30 min (Figura 5 A). A pesar de esto se observa que hay reacción al estímulo realizado. En estadio 24 y 25, el embrión se pega a la membrana vitelina, se ve la formación de una burbuja, hay movimiento de agitación por parte del embrión, se rompe la membrana vitelina y el embrión sale del huevo (Figura 5B y 5C; Video 1 y 2). Se observa que, en algunos casos, el embrión pega la parte frontal de la cabeza o la dorsal o las ambas. La eclosión en estadio 24 ocurrió en un promedio de 34 minutos y en estadio 25, 21 minutos (Figura 5 B y C).

De igual forma, en *Hyloxalus nexipus* no hay eclosión en estadio 23 (Figura 6A). En estadio 24 hay eclosión casi a los 19 minutos (Figura 6B) y en estadio 25 a los 6 minutos (Figura 6C). También se observó que el embrión se pega a la membrana vitelina con la parte frontal de cabeza, se forma una burbuja, se rompe la membrana y el embrión sale (Figura 6B y 6C; Video 3 y 4).

Al comparar el tiempo de eclosión entre ambas especies en los mismos estadios se ven diferencias significativas ($p < 0.01$). *Epipedobates tricolor* eclosiona más tarde que *Hyloxalus*

nexipus en estadio 24 y 25. *H. nexipus*, en estadio 24 se demora la mitad de tiempo (promedio 16 minutos) que *E. tricolor* (34 minutos). Mientras que en estadio 25 los embriones de *H. nexipus* eclosionan en promedio a los 7 min, en comparación con 21 minutos de los embriones de *E. tricolor* (Figura 7).

DISCUSIÓN

Hasta ahora, la presencia de glándulas de eclosión, en el orden Anura se ha descrito en 8 familias diferentes Bufonidae, Pipidae, Hylidae, Leptodactylidae, Microhylidae, Ranidae, Centrolenidae y Phyllomedusidae (Cohen et al., 2018b; Downie et al., 2013; Drysdale y Elinson, 1991; Kitamura y Katagiri, 1998; Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007; Nokhbatolfoghahai et al., 2014). Sin embargo, es la primera vez que se documenta la presencia de HGC, su morfología y distribución en la familia Dendrobatidae.

En diferentes estudios se observa que la presencia de glándulas de eclosión se da en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Nokhbatolfoghahai y Downie (2007) muestran la presencia de glándulas de eclosión desde el estadio 15 hasta el 18 (Gosner, 1960) en 19 especies. También en *Hyalinobatrachium orientale* (Nokhbatolfoghahai, Pollock, y Downie, 2015), *Bufo japonicus* (Yamasaki et al., 1990), *Xenopus laevis* (Carroll y Hedrick, 1974; Drysdale y Elinson, 1991; Yoshizaki, 1973), *Rana chinensis* (Yoshizaki y Katagiri, 1975) y *Rana japonica* (Yoshizaki, 1978) se describe la presencia de HGC desde estadio 19 hasta el 22. Además, en *Agalychnis callidryas*, hay la presencia de 2 tipos de HGC. Las primeras aparecen a los 3 días (HGC tempranas) y las segundas (HGC tardías) a los 4 días pos-fertilización (Cohen et al., 2016; Cohen et al., 2018b). Al contrario, *Epipedobates tricolor* e *Hyloxalus nexipus*, las dos

especies estudiadas, presentan glándulas de eclosión en los estadios más tardíos del desarrollo (24 y 25).

Por otra parte, la distribución de las glándulas de eclosión en *Hyloxalus nexipus* y *Epipedobates tricolor*, combinan 2 distribuciones anteriormente descritas. En primer lugar, la distribución de las HGC desde una vista frontal, en estadio 25 de ambas especies concuerda con la descrita por Cohen y colaboradores (2018b) en *Agalychnis callidryas*. Las glándulas se observan desde la parte superior de la cabeza hasta el hocico y con una mayor concentración entre las narinas (Cohen et al., 2018b). Así mismo, la presencia de HGC en la zona dorsal ha sido descrita para varias especies. Estas pueden extenderse hasta 1/3 del embrión siguiendo la línea media dorsal (Cohen et al., 2018b; Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007; Nokhbatolfoghahai et al., 2014). A pesar de que hay presencia de HGC dorsales en *E. tricolor* difiere de lo descrito, ya que las glándulas se presentan en parches y no en una línea continua como se ha documentado para otras especies. A pesar de que, Nokhbatolfoghahai y Downie (2007) muestran que la mayoría de las especies estudiadas poseen una distribución en forma de T o Y desde una vista dorsal, en este estudio no se encontró ese mismo patrón en ninguna de las 2 especies. Esto puede deberse a que la distribución descrita por Nokhbatolfoghahai y Downie (2007) es en embriones con presencia de HGC en estadios tempranos del desarrollo, lo que no se asemeja a las especies de este estudio.

Además de la diferencia en el tiempo de aparición y la distribución de las HGC en esta familia, la morfología de las glándulas de eclosión, observadas en SEM, varía entre estadios y entre las dos especies, pero son similares a HGC descritas en otras especies. Las HGC tempranas de *Agalychnis callidryas* aparecen a los 3 días, son pequeñas, con microvilli notorio y rodeadas de células epiteliales. La morfología de las glándulas de eclosión en estadio 23 y algunas en 24 de

Hyloxalus nexipus son similares a las HGC tempranas de *A. callidryas* (Cohen et al., 2018b; Cohen, 2017) y a las de *Hyla geographica* (Hylidae) en estadio 22 (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007). En comparación, las glándulas en estadio 25 (*H. nexipus*) se asemejan a las observadas por Nokhbatolfoghahai y Downie (2007) en las especies *Elachistocleis ovalis* (st 19, Microhylidae) y *Leptodactylus fuscus* (st 23, Leptodactylidae), ya que son abundantes, cercanas entre sí, de redondeadas a poligonales, con relieve y poco microvilli. Por el contrario, *Epipedobates tricolor*, en estadio 25 posee HGC con una forma poligonal y corto microvilli, lo que las asemeja a las de *Hyla minuta* y *Phrynohyas venulosa* (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007) y también a las HGC tardías de *A. callidryas* (Cohen et al., 2018a). Al comprar la diversidad de HGC observadas y descritas, no se puede asegurar que existan 2 tipos de glándulas en *H. nexipus* y *E. tricolor* como en *A. callidryas* (Cohen et al., 2018b). Sin embargo, las HGC en estas especies pueden ir modificando su morfología a lo largo de los diferentes estadios, como se ha descrito en otras especies (Cohen et al., 2018b; Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007), hasta llegar a una etapa en la que estén listas para liberar enzima de eclosión.

Por otro lado, el tiempo que toma la eclosión puede variar dentro de los Anuros. Hay especies como *Xenopus laevis*, *Bufo japonicus* y *Rana japónica* en los que la eclosión se da en 2 etapas en estadios tempranos. Primero salen de las membranas de gelatina y luego de la vitelina, haciendo que la eclosión sea un proceso lento y gradual durando aproximadamente 3-6 horas (Carroll y Hedrick, 1974; Yamasaki et al., 1990; Yoshizaki, 1978). Al contrario, *Agalychnis callidryas* puede acelerar la eclosión en respuesta a ataques de serpientes (Warkentin, Caldwell, Siok, D'Amato, y McDaniel, 2007) y al estímulo mecánico (Cohen et al., 2016) tardando entre 6 a 50 segundos en salir del huevo y evitar la depredación. Sin embargo, en las especies estudiadas, el tiempo de eclosión varía en los diferentes estadios y entre las especies. En

Hyloxalus nexipus y *Epipedobates tricolor*, la eclosión en estadio 24 toma aproximadamente 18 y 35 minutos y en estadio 25, 6 y 21 minutos respectivamente. Estas diferencias en los tiempos de eclosión pueden deberse a las distintas estrategias reproductivas. *X. laevis*, *B. japonicus* y *R. japonica* colocan sus huevos en el agua y *A. callidryas* en hojas sobre cuerpos de agua, todas sin cuidado parental lo que permite que los huevos estén expuestos a diferentes amenazas y sea necesaria una eclosión adaptativa para evitar predadores y asegurar la supervivencia. El cuidado parental otorgado por los machos de *H. nexipus* y *E. tricolor* (Summers y Tumulty, 2013) facilita que los embriones se desarrollen completamente en un ambiente homogéneo y protegido, por lo que no es necesaria una eclosión rápida y temprana.

La adaptación ecológica a una eclosión temprana o eclosión ecológica (Environmentally cued hatching o ECH) por la influencia de factores bióticos y abióticos ha sido documentada en algunos casos. *Agalychnis callidryas* puede acelerar la eclosión (30 %) en respuesta a la desecación, falta de oxígeno, presencia de hongos y estímulos por predadores, siendo a los 3 días posfertilización la eclosión más temprana (Cohen et al., 2018a; Salica, Vonesh, y Warkentin, 2017; Warkentin, 1995; Warkentin, 2011a, 2011b; Warkentin, Currie, y Rehner, 2009). Además, la presencia de hongos permite que *Bufo americanus* adelante la eclosión en un 44 % (estadio 17) (Gosner, 1960; Touchon et al., 2006) y 13.5 % más temprana en *Dendropsophus ebraccatus* por el ataque de hormigas (Cohen, 2017). Estas especies poseen HGL en los estadios tempranos del desarrollo, lo que permite esta eclosión rápida y temprana frente a diferentes estímulos (Cohen, 2017; Warkentin, 2011a, 2011b). A diferencia de estas especies, la capacidad de eclosionar tempranamente por estímulos externos es algo que no se ve en *Hyloxalus nexipus* y *Epipedobates tricolor*. Los videos de eclosión muestran que los embriones salen del huevo únicamente en estadios 24 y 25 al estar expuestos al estímulo de

agitación y no poseen HGC funcionales antes del estadio 24, por lo que la capacidad de eclosionar en estadios tempranos queda limitada. Sin embargo, la capacidad de eclosión en estadio 24 de las dos especies puede ser una forma de adaptación ecológica a la ausencia de cuidado parental como se ha visto en *Hyalinobatrachium fleischmanni* (Centrolenidae). En esta especie, al remover al padre y evitar que los huevos posean cuidado se observó deshidratación, lo que indujo una eclosión temprana que normalmente no se observa si hay un cuidado parental (Delia et al., 2014), lo que podría explicar la adaptación de eclosión en estadio 24 de *H. nexipus* y *E. tricolor*. Dentro de la familia Dendrobatidae aún son necesarias otras investigaciones para determinar el rol de los padres durante la eclosión y su comportamiento. En *Ranitomeya imitator* (Dendrobatidae) se ha observado que los machos manipulan los huevos al momento de la eclosión, pero no se tiene claro si rompen el huevo, estimulan la eclosión o usan ambas estrategias al mismo (Brown et al., 2008; Warkentin, 2011b). Pese a lo encontrado en este estudio, aún se desconoce por completo el rol de los padres y si la eclosión temprana puede ocurrir por otros factores como la deshidratación, la falta de oxígeno o presencia de hongos, por lo que es necesario seguir investigando.

A pesar de la baja capacidad en la eclosión adaptativa y la falta de estudios en esta familia, los videos de eclosión por estímulo muestran diferentes comportamientos que se han descritos para otras especies. Tanto en los embriones de *Epipedobates tricolor* como en *Hyloxalus nexipus* se observa el comportamiento de agitación previo a la formación de una burbuja en la membrana. Este comportamiento de agitación es un indicador de la liberación de enzima e inicio del proceso de eclosión en *Agallychnis callydrias* (Phyllomedusidae). El movimiento permite que los embriones acerquen el hocico (lugar donde se encuentran las HGC) a la membrana vitelina para evitar la dispersión de la enzima y así tener una ruptura localizada (Cohen et al., 2016). De

la misma forma, Carroll y Hedrick (1974) y Yoshizaki (1978) muestran que hay movimiento de sacudida previo a la formación de una ampolla o “bleb” en *Xenopus laevis* y *Rana japonica*, esto permite que el embrión se pegue a la membrana del huevo, libere HE y posteriormente rompa la membrana que los rodea. Al igual que estas especies, el comportamiento de agitación en *H. nexipus* y *E. tricolor* permite un acercamiento a la membrana vitelina para la liberación de HE, con la formación de una ampolla o “bleb” y una posterior ruptura de la membrana. La liberación de la enzima aparte de ser localizada, no se da por completo. Cohen, Seid y Warkentin (2016) al realizar experimentos de desplazamiento en *A. callydrias*, pudieron observar que los embriones son capaces de formar una segunda ruptura en la membrana vitelina al ser movidos del lugar inicial pero no encontraron HGC intactas al observar embriones eclosionados por SEM. En las 2 especies estudiadas *E. tricolor* y *H. nexipus* se observa la formación de más de una ampolla de eclosión en estadio 25, al igual que *A. callydrias*, sin embargo, si se logró identificar la expresión del anticuerpo HE y la presencia HGC intactas (SEM) en embriones eclosionados. Nuestros datos afirman y concuerdan con los resultados obtenidos en el estudio de Cohen y colaboradores (2016) que la liberación de enzima de eclosión no se da toda al mismo tiempo y puede ser retenida para la formación de una segunda ruptura en la membrana.

En conclusión, los embriones de *Hyloxalus nexipus* y *Epipedobates tricolor* poseen una ontogenia y morfología de las HGC diferente a los patrones ya observados, pero su distribución se asemeja a otras ya descritas. Además, las HGC cambian entre los estadios 23 y 24, haciendo que las glándulas estén listas para generar una eclosión en los estadios más avanzados (24 y 25). La ausencia de HGC funcionales en estadios tempranos limita la capacidad de una eclosión prematura en estas especies, sin embargo, el cuidado parental crea un ambiente adecuado para

que este tipo de eclosión no sea necesaria y los embriones se desarrollen completamente. No obstante, aún hacen falta investigaciones sobre el rol que ejercen los padres en la eclosión de los embriones y si otros estímulos bióticos y abióticos causan eclosión temprana en estas especies y otras dentro de la misma familia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre y padre por apoyarme incondicionalmente para cumplir mis metas y por darme su ejemplo de sacrificio, trabajo duro y esfuerzo. A mi hermano y abuelos por todo su cariño.

A mis amigos por todos los momentos y experiencias compartidas durante estos 5 años. Especialmente a Erika, Sofía y Camilo por los buenos y malos momentos, su confianza, motivación, desafíos y más que nada por su amistad.

Agradezco de manera especial al Dr. Andrés Romero-Carvajal por haberme permitido formar parte del laboratorio, por cada enseñanza brindada, por el apoyo y motivación incondicional, desarrollo profesional y por guiarme en el camino de hacer ciencia. A María José Salazar por sus enseñanzas, sugerencias y apoyo en el laboratorio. Y a todos los que forman parte del Laboratorio de Biología del Desarrollo por los buenos momentos compartidos.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento para la realización del proyecto, a todos los que conforman la Escuela de Ciencias Biológicas y a la Iniciativa de Conservación Balsa de los Sapos por los especímenes brindados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altig, R., y McDiarmid, R. (1999). Body-plan development and morphology. En *Tadpoles: The Biology of Anuran larvae* (pp. 24–51). Chicago: University of Chicago Press.
- Brivanlou, A. H., y Harland, R. M. (1989). Expression of an engrailed-related protein is induced in the anterior neural ectoderm of early *Xenopus* embryos. *Development*, *106*(3), 611–617.
- Brown, J. L., Twomey, E., Summers, K., y Morales, V. (2008). Phytotelm size in relation to parental care and mating strategies in two species of Peruvian poison frogs. *Behaviour*, *145*(9), 1139–1165. <https://doi.org/10.1163/156853908785387647>
- Carroll, E. J., y Hedrick, J. L. (1974). Hatching in the toad *Xenopus laevis*: Morphological events and evidence for a hatching enzyme. *Developmental Biology*, *38*(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(74\)90254-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(74)90254-1)
- Cohen, K. L. (2017). *Anuran hatching mechanisms and their role in adaptive plasticity*. Boston University.
- Cohen, K. L., Piacentino, M. L., y Warkentin, K. M. (2018a). Two types of hatching gland cells facilitate escape-hatching at different developmental stages in red-eyed treefrogs, *Agalychnis callidryas* (Anura: Phyllomedusidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 1–17. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly214>
- Cohen, K. L., Piacentino, M. L., y Warkentin, K. M. (2018b). The hatching process and mechanisms of adaptive hatching acceleration in hourglass treefrogs, *Dendropsophus ebraccatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and*

Integrative Physiology, 217, 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.020>

Cohen, K. L., Seid, M. A., y Warkentin, K. M. (2016). How embryos escape from danger: the mechanism of rapid, plastic hatching in red-eyed treefrogs. *The Journal of Experimental Biology*, 219(12), 1875–1883. <https://doi.org/10.1242/jeb.139519>

Contreras Cisneros, J. D. (2015). Descripción morfológica de los embriones de *Hyloxalus nexipus* (Anura: Dendrobatidae) desde el clivaje hasta la eclosión del renacuajo. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Del Pino, E. M., Ávila, M. E., Pérez, O. D., Benítez, M. S., Alarcón, I., Noboa, V., y Moya, I. M. (2004). Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *International Journal of Developmental Biology*, 48(7), 663–670. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041861ed>

Delia, J. R. J., Ramírez-Bautista, A., y Summers, K. (2014). Glassfrog embryos hatch early after parental desertion. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1785). <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.3237>

Downie, J. R., Nokhbatolfoghahai, M., Bruce, D., Smith, J. M., Orthmann-Brask, N., y MacDonald-Allan, I. (2013). Nest structure, incubation and hatching in the Trinidadian leaf-frog *Phyllomedusa trinitatis* (Anura: Hylidae). *Phyllomedusa*, 12(1), 13–32. <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v12i1p13-32>

Drysdale, T. A., y Elinson, R. P. (1991). Development of the *Xenopus laevis* hatching gland and its relationship to surface ectoderm patterning. *Development*, 478(111), 469–478.

Gosner, K. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on

identification. *Herpetologica*, 16(3), 183–190.

Guangzhou Micro-shot Technology. (2014). Mshot Fluorescence Microscope Solutions.

Recuperado el 28 de febrero de 2020, de <http://www.m-shot.com/index.php?a=index&m=Page&id=28>

Guerra, S., y Debut, A. (2012). Comparación entre cuatro protocolos para la preparación de muestras de referencia usando el Microscopio Electrónico de Barrido. *Ciencia y Tecnología*, ISSN, 1390–4663.

Hervas, F., Torres, K. P., Montenegro-Larrea, P., y Del Pino, E. M. (2015). Development and gastrulation in *Hyloxalus vertebralis* and *Dendrobates auratus* (Anura: Dendrobatidae) Official journal website: amphibian-reptile-conservation.org. *Amphibian & Reptile Conservation*, 8(2), 121–135.

Kitamura, Y., y Katagiri, C. (1998). Characterization of the hatching enzyme from embryos of an anuran amphibian, *Rana pirica*. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1387(1–2), 153–164. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00117-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00117-4)

Martin, K. L. M. (1999). Ready and waiting: delayed hatching and extended incubation of anamniotic vertebrate terrestrial eggs 1. *American Zoologist*, 288, 279–288. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/icb/39.2.279>

Nieuwkoop, P. D., y Faber, J. (1994). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin): A systematical and chronological survey of the development of the fertilized egg till the end of metamorphosis. *Garland Publishing Inc.* New York, USA.

- Nokhbatolfoghahai, M., y Downie, J. R. (2007). Amphibian hatching gland cells: Pattern and distribution in anurans. *Tissue and Cell*, 39(4), 225–240.
<https://doi.org/10.1016/j.tice.2007.04.003>
- Nokhbatolfoghahai, M, Pollock, C. J., y Downie, J. R. (2015). Oviposition and development in the glass frog *Hyalinobatrachium orientale tobagoense*(Hardy, 1984). *Phyllomedusa*, 14(November 2014), 3–17.
- Olympus Corporation. (2020). Software cellSens. Recuperado el 29 de febrero de 2020, de <https://www.olympus-lifescience.com/es/software/cellsens/>
- Salica, M. J., Vonesh, J. R., y Warkentin, K. M. (2017). Egg clutch dehydration induces early hatching in red-eyed treefrogs, *Agalychnis callidryas*. *PeerJ*, 2017(7).
<https://doi.org/10.7717/peerj.3549>
- Salthe, S. N. (1963). The egg capsules in the amphibia. *Journal of Morphology*, 113(2), 161–171. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051130204>
- Savage, J. M. (2002). The amphibians and reptiles of Costa Rica. Chicago: University of Chicago Press.
- Summers, K., y Tumulty, J. (2013). Parental care, sexual selection, and mating systems in neotropical poison frogs. *Sexual Selection: Perspectives and Models from the Neotropics*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416028-6.00011-6>
- Touchon, J. C., Gomez-Mestre, I., y Warkentin, K. M. (2006). Hatching plasticity in two temperate anurans: Responses to a pathogen and predation cues. *Canadian Journal of Zoology*, 84(4), 556–563. <https://doi.org/10.1139/Z06-058>

- Warkentin, K. M. (1995). Adaptive plasticity in hatching age: A response to predation risk trade-offs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8), 3507–3510. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3507>
- Warkentin, K. M. (2011a). Environmentally cued hatching across taxa: Embryos respond to risk and opportunity. *Integrative and Comparative Biology*, 51(1), 14–25. <https://doi.org/10.1093/icb/icr017>
- Warkentin, K. M. (2011b). Plasticity of hatching in amphibians: Evolution, trade-offs, cues and mechanisms. *Integrative and Comparative Biology*, 51(1), 111–127. <https://doi.org/10.1093/icb/icr046>
- Warkentin, K. M., Caldwell, M. S., Siok, T. D., D’Amato, A. T., y McDaniel, J. G. (2007). Flexible information sampling in vibrational assessment of predation risk by red-eyed treefrog embryos. *Journal of Experimental Biology*, 210(4), 614–619. <https://doi.org/10.1242/jeb.001362>
- Warkentin, K. M, Currie, C. R., y Rehner, S. A. (2009). Egg-killing fungus induces early hatching of red-eyed treefrog eggs. *Ecology*, 82(10), 2860–2869.
- Wells, D. (2010). The ecology and behavior of amphibians. Chicago: University of Chicago Press.
- Weygoldt, P. (1987). Evolution of parental care in dart poison frogs (Amphibia: Anura: Dendrobatidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 25(1), 51–67. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.1987.tb00913.x>
- Yamasaki, H., Katagiri, C., y Yoshizaki, N. (1990). Selective degradation of specific

components of fertilization coat and differentiation of hatching gland cells during the two phase hatching of *Bufo japonicus* embryos: toad/hatching gland cell/fertilization coat hydrolysis/hatching medium. *Development, Growth & Differentiation*, 32(1), 65–72.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1990.00065.x>

Yoshizaki, N. (1973). Instructions for use ultrastructure of the hatching gland cells in the South African clawed toad , *Xenopus laevis*. *Zoological Institute Hokkaido University*, 18(4), 469–480.

Yoshizaki, N. (1978). Disintegration of the vitelline coat during the hatching process in the frog. *Journal of Experimental Zoology*, 203(1), 127–133.
<https://doi.org/10.1002/jez.1402030112>

Yoshizaki, N., y Katagiri, C. (1975). Cellular basis for the production and secretion of the hatching enzyme by frog embryos. *Journal of Experimental Zoology*, 192(2), 203–212.
<https://doi.org/10.1002/jez.1401920210>

FIGURAS

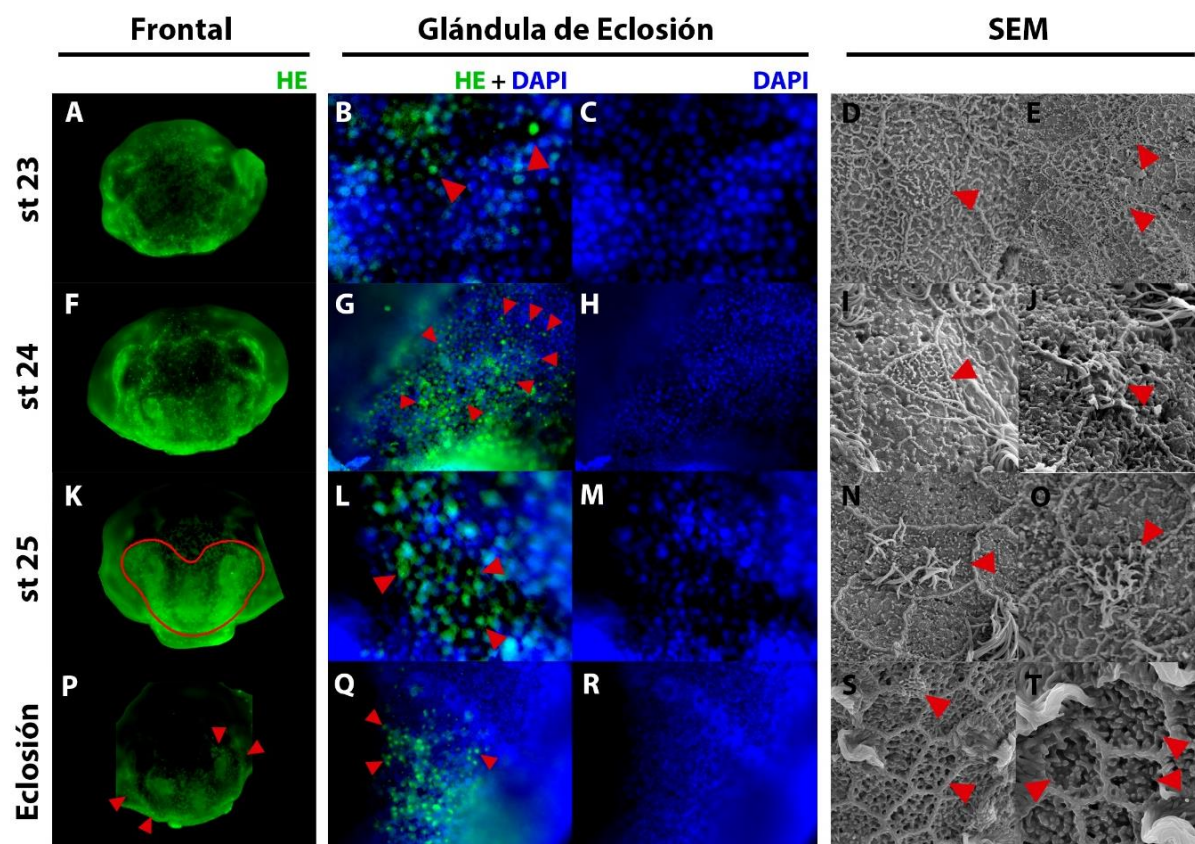


Figura 1. Vista frontal de las glándulas de eclosión (HGC) en *Epipedobates tricolor*. Las HGC desde una vista frontal están presentes en estadios tardíos cercanos a la eclosión en *Epipedobates tricolor*. (A, F, K, P) Vista frontal de embriones con tinción para HE (flechas y líneas rojas muestran expresión). (B, G, L, Q) Acercamiento a glándulas de eclosión con tinción HE + DAPI y (C, H, M, R) únicamente DAPI. (D, E, I, J, N, O, S, T) Diferentes tipos de glándulas de eclosión con SEM. (A-E) estadio 23. (F-J) estadio 24. (K-O) estadio 25. (P-T) eclosión. (B) Pocas células marcadas con HE en la parte frontal. (D, E) Hay 2 morfologías diferentes en la zona frontal. (G) Acumulación de células marcadas con HE cerca a narinas. (I, J) Se observan diferentes morfologías con SEM. (K, L) Todas las células se observan en zona anterior entre narinas hasta parte inferior del hocico. (N, O) Se encontró morfologías distintas

en la misma zona de la expresión. (P, Q) Después de la eclosión existe expresión en pocas zonas de la parte anterior de la cabeza. (S, T) se observan depresiones en las zonas en donde se encontraban las HGC y células con perforaciones. St25, estadio 25; st24, estadio 24; st23, estadio 23; HE, hatching enzyme o enzima de eclosión.

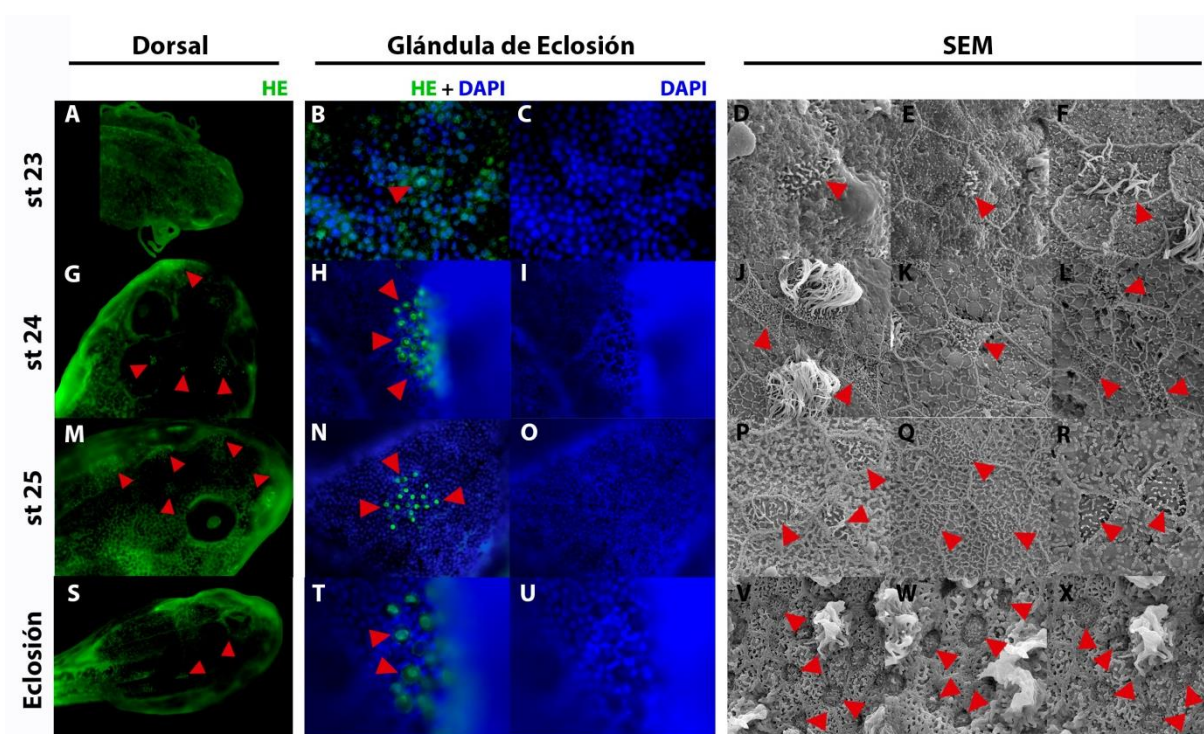


Figura 2. Vista dorsal de las glándulas de eclosión (HGC) en *Epipedobates tricolor*. En la zona dorsal de *Epipedobates tricolor*, la presencia de glándulas de eclosión ocurre en parches y es cercana al momento de la eclosión. (A, G, M, S) Vista dorsal de embriones con tinción para HE (flechas rojas muestran expresión). (B, H, N, T) Acercamiento a glándulas de eclosión con tinción HE + DAPI y (C, I, O, U) únicamente DAPI. (D, E, F, J, K, L, P, Q, R, V, W, X) Diferentes tipos de glándulas de eclosión con SEM. (A-F) estadio 23. (G-K) estadio 24. (M-R) estadio 25. (S-X) eclosión. (B) En zona dorsal se observan pocas células marcadas con HE. (D-F) La morfología se ve similar entre las HGC. (G, H) Hay expresión en parches pequeños en la parte posterior a los ojos. (J-L) Las HGC poseen una forma poligonal. (M, N) Mayor cantidad de HGC en parches desde la mitad del embrión hasta la parte anterior. (P-R) Glándulas de eclosión siguen con una morfología poligonal pero redondeada y en algunos casos con relieve. (S, T) Después de la eclosión existe expresión en pocas zonas de la parte anterior de la cabeza.

(V-X) Se observan depresiones en las zonas en donde se encontraban las HGC. St25, estadio 25; st24, estadio 24; st23, estadio 23; HE, hatching enzyme o enzima de eclosión.

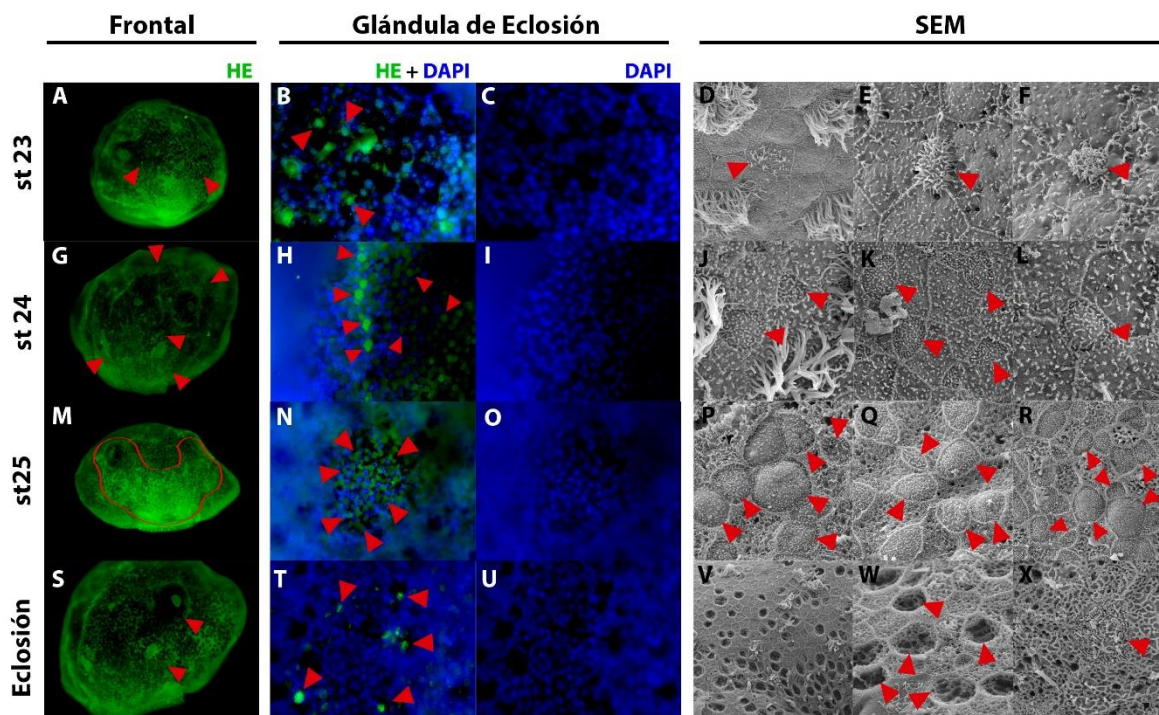


Figura 3. Vista frontal de las glándulas de eclosión (HGC) en *Hyloxalus nexipus*. La presencia de glándulas de eclosión, en la zona frontal de *Hyloxalus nexipus* es cercana al momento de la eclosión. (A, G, M, S) Vista frontal de embriones con tinción para HE (flechas y líneas rojas muestran expresión). (B, H, N, T) Acercamiento a glándulas de eclosión con tinción HE + DAPI y (C, I, O, U) únicamente DAPI. (D, E, F, J, K, L, P, Q, R, V, W, X) Diferentes tipos de glándulas de eclosión con SEM. (A-F) estadio 23. (G-K) estadio 24. (M-R) estadio 25. (S-X) eclosión. (A, B) Se observan pocas células marcadas con HE cercanas a los ojos y hocico. (D-F) Las HGC están distribuidas en toda la zona frontal y la mayoría son pequeñas y redondeadas. (G, H) Hay expresión desde la zona posterior de los ojos hasta el hocico, se ve acumulación de HGC. (J-L) Las HGC poseen una forma redondeada y se encuentran cercanas unas de otras. (M, N) Aglomeración de glándulas de eclosión desde los ojos hasta el hocico, mayormente entre las narinas. (P-R) El SEM muestra que las HGC están apegadas entre sí, son redondeadas con diferentes tamaños, pero todas cercanas a las narinas y

hocico. (S, T) Después de la eclosión existen pocas células que se marcan con el anticuerpo HE. (V-X) Se observan huecos en las zonas en donde se encontraban las HGC. St25, estadio 25; st24, estadio 24; st23, estadio 23; HE, hatching enzyme o enzima de eclosión.

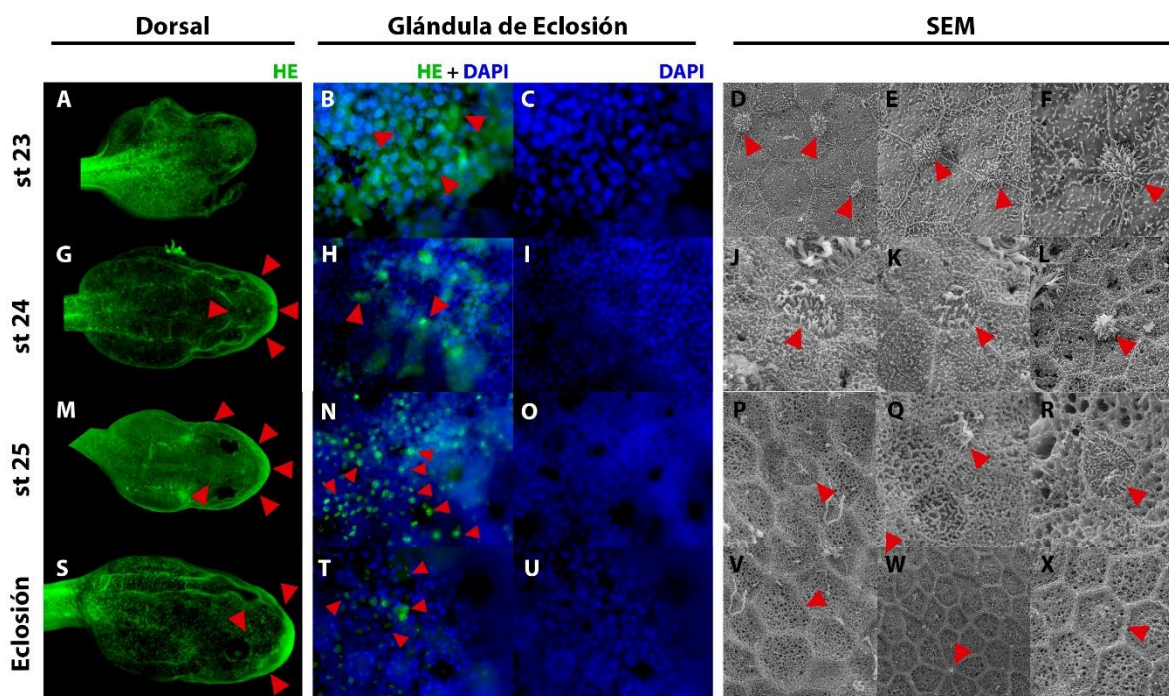


Figura 4. Vista dorsal de las glándulas de eclósión (HGC) en *Hyloxalus nexipus*. En *Hyloxalus nexipus* (vista dorsal), la presencia de glándulas de eclósión es en estadios tardíos antes de la eclósión y en la parte más anterior de embrión. (A, G, M, S) Vista dorsal de embriones con tinción para HE (flechas rojas muestran expresión). (B, H, N, T) Acercamiento a glándulas de eclósión con tinción HE + DAPI y (C, I, O, U) únicamente DAPI. (D, E, F, J, K, L, P, Q, R, V, W, X) Diferentes tipos de glándulas de eclósión con SEM. (A-F) estadio 23. (G-K) estadio 24. (M-R) estadio 25. (S-X) eclósión. (B) Hay pocas células marcadas con el anticuerpo HE. (D-F) Se observan pequeñas HGC redondas cercanas una de otras. (G, H) Las HGC marcadas están en la zona más anterior del embrión. (J-L) Hay diferentes morfologías de glándulas todas cercanas al hocico. (M, N) La detección es mayor en st25, pocas células se encuentran detrás de los ojos. (P-R) El tamaño de las HGC es mayor pero no se encontraron todas en una zona específica. (S, T) Después de la eclósión existen pocas células que se marcan con el anticuerpo HE, pero todas ubicadas hacia la parte anterior del embrión. (V-X) Se

observan depresiones en las zonas en donde se encontraban las HGC y pequeños agujeros en las células. St25, estadio 25; st24, estadio 24; st23, estadio 23; HE, hatching enzyme o enzima de eclosión.



Figura 5. Eclosión por estímulo en *Epipebobates tricolor*. La eclosión por estímulo de *Epipebobates tricolor* ocurre únicamente en estadio 24 y 25. En todas las secuencias se inicia el estímulo a los 10 segundos. (A) En estadio 23 no hay eclosión por estímulo (60 min). (B) Aproximadamente a los 34 minutos ocurre la eclosión en estadio 24, hay la formación una burbuja (flecha roja). (C) La eclosión ocurre a los 21 minutos en estadio 25, también hay formación de burbuja (no se muestra). St25, estadio 25; st24, estadio 24; st23, estadio 23.

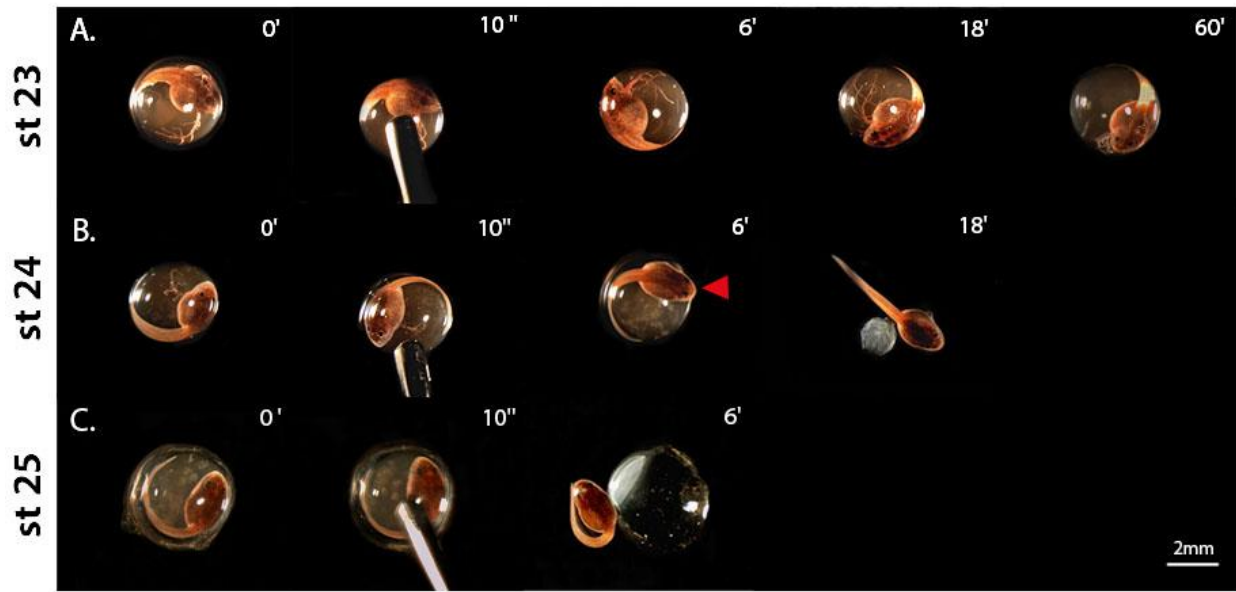


Figura 6. Eclosión por estímulo en *Hyloxalus nexipus*. En *Hyloxalus nexipus*, la eclosión por estímulo se da en los estadios finales. A los 10 segundos se inicia estímulo en todas las secuencias de imágenes. (A) El estímulo continuo durante 60 minutos no provocó eclosión en estadio 23. (B) En estadio 24, a los 18 minutos ocurre la eclosión y se observa una burbuja de eclosión. (C) El estímulo provoca la eclosión a los 6 minutos (estadio 25), también hay formación de burbuja (no se muestra). St25, estadio 25; st24, estadio 24; st23, estadio 23.

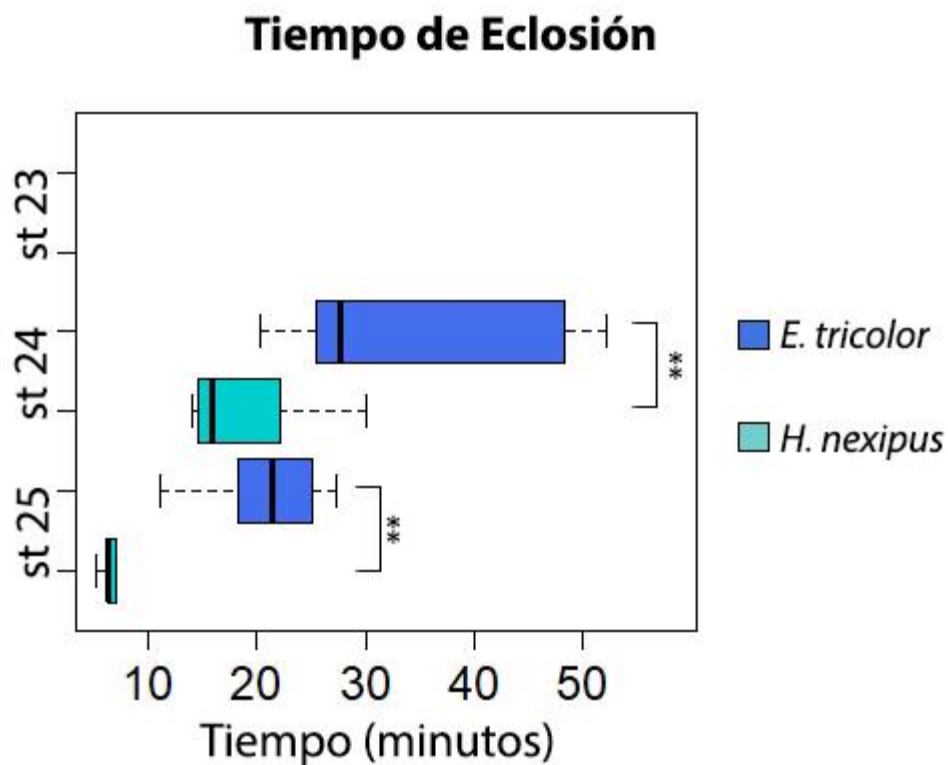


Figura 7. Comparación en el tiempo de eclosión entre *Epipedobates tricolor* e *Hyloxalus nexipus*. El tiempo de eclosión de *E. tricolor* (azul) y *H. nexipus* (cian) en estadios 24 y 25 es diferente. La eclosión fue analizada en 60 videos (30 de *H. nexipus* y 30 de *E. tricolor*). En estadio 23 no hay eclosión en ambas especies después de 60 minutos. En estadio 24, *H. nexipus* eclosiona en menor tiempo (18 minutos) que *E. tricolor* (34 minutos). En estadio 25, *E. tricolor* eclosiona en promedio en 21 minutos y *H. nexipus* en 6 minutos. St25, estadio 25; st24, estadio 24; st23, estadio 23.

<https://www.youtube.com/watch?v=RKaHUkaTfdE>

Video 1. Eclosión por estímulo de *Epipedobates tricolor* en estadio 24.

https://www.youtube.com/watch?v=ucGCMa_51GA

Video 2. Eclosión por estímulo de *Epipedobates tricolor* en estadio 25.

<https://www.youtube.com/watch?v=4E8nGnzEGDs>

Video 3. Eclosión por estímulo de *Hyloxalus nexipus* en estadio 24.

<https://www.youtube.com/watch?v=sY43ALRJCx8>

Video 4. Eclosión por estímulo de *Hyloxalus nexipus* en estadio 25.