PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Descripción del desarrollo embrionario de órganos adaptativos para la vida acuática en *Epipedobates anthonyi*

Disertación previa a la obtención del título de

Licenciada en Ciencias Biológicas

KARINA ALEXANDRA LOPEZ RUANO

Quito, 2020

Description of the embryonic development of adaptive organs for aquatic life in *Epipedobates anthonyi*

Descripción del desarrollo embrionario de órganos adaptativos para la vida acuática en *Epipedobates anthonyi*

Karina Lopez-Ruano,[1] Andrés Romero-Carvajal[1,] *

[1]Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador

*Corresponding author. E-mail: maromero@puce.edu.ec

RESUMEN.- Comprender el desarrollo de órganos adaptativos para la vida acuática en Dendrobátidos, permite ampliar el conocimiento de las adaptaciones embrionarias al ambiente. En este estudio describimos el desarrollo de órganos importantes para la vida larvaria: las branquias y la línea lateral. Para describir el desarrollo de las branquias embrionarias se detalla el crecimiento, la regresión, los procesos apoptóticos y la estructura branquial. Para el estudio del desarrollo de la línea lateral se realizaron inmunotinciones de serotonina-vimentina para determinar el seguimiento de las neuritas en la formación de la línea lateral y comprobar la existencia de actividad serotoninérgica. Se demuestra que el desarrollo de las branquias externas es un proceso sincrónico al contrario de la regresión branquial. La apoptosis y la disminución en la expresión de la vimentina son sucesos que anteceden una transición eficiente de branquias externas a internas. El estudio en la línea lateral en cambio, muestra por primera vez la expresión de la vimentina en estadios tempranos del desarrollo de la línea lateral, mientras que la expresión de la serotonina aparece a partir de la diferenciación de los neuromastos.

PALABRAS CLAVE.- Desarrollo branquial, línea lateral, naranja de acridina, serotonina, vimentina.

ABSTRACT. - Understanding the development of adaptive organs for aquatic life in Dendrobatids, allows us to expand our knowledge of embryonic adaptations to the environment. In this study, we described the development of organs important for larval life: the gills and the lateral line. To study branchial development, growth, regression, apoptotic processes, and branchial structure are detailed. For the study of the development of the lateral line, serotonin-vimentin immunostaining was performed to determine neurite tracking during the lateral line formation, and to verify the existence of serotoninergic activity. The development of the external gills is a synchronous process contrary to the gill regression. Apoptosis and decreased expression of vimentin are events that precede an efficient transition from external to internal gills. The study in the lateral line, on the other hand, shows for the first time the expression of vimentin in the early stages of the development of the lateral line, while the expression of serotonin appears from the differentiated of neuromasts.

KEYWORDS. - Acridine orange, gills development, lateral line, serotonin, vimentin.

Descripción del desarrollo embrionario de órganos adaptativos para la vida acuática en *Epipedobates anthonyi*

INTRODUCCIÓN

Una de las fases de desarrollo más importantes en los anuros es la transición de la fase embrionaria a la fase larvaria. En esta etapa se forman los órganos que van a permitir la supervivencia de las larvas en un ambiente acuático. Mientras se desarrollan estos órganos, el embrión además tiene sus propios requerimientos para poder desarrollarse y sobrevivir. Existen estructuras transitorias útiles solamente en la etapa embrionaria que permiten solventar estas necesidades y que desaparecerán por completo en la etapa larvaria (Warkentin 2002). Las estructuras transitorias son variadas, entre otras: la yema que solventa la necesidad energética del embrión (Flickinger et al. 1957) y las branquias externas que permiten el intercambio gaseoso hasta la eclosión (Warkentin 2002).

El estudio del desarrollo de estructuras transitorias permite tener una visión más clara sobre la supervivencia embrionaria y su relación con las adaptaciones requeridas para la vida acuática. En anuros se desarrollan órganos transitorios que se caracterizan distintivamente por estar presentes solo en etapas de la vida acuática y, por lo tanto, generalmente está restringido a las larvas. Las estructuras acuáticas transitorias más características de anuros son: las branquias internas, por estar involucrados en el intercambio gaseoso en el agua y la línea lateral, por ser un sistema sensible a los movimientos del agua generados por presas y congéneres (Dijkgraaf 1963; Uchiyama y Yoshizawa 1992; Quinzio y Fabrezi 2014; Warkentin 2002).

Los anuros tienen branquias externas e internas, las cuales difieren en su desarrollo y función (Nokhbatolfoghahai y Downie 2008). Inicialmente se desarrollan las branquias externas de carácter transitorio, las cuales participan en el intercambio gaseoso embrionario y por medio de la difusión se encargan de la quimiorecepción de oxígeno debido a la inervación sensorial de los nervios craneales (Jonz y Nurse 2006; Saltys et al. 2006). El desarrollo de las branquias externas reportado en Dendrobátidos empieza a partir de las yemas branquiales, las cuales sobresalen del tercer y cuarto arco branquial del embrión, seguido de su elongación, ramificación y regresión antes de la eclosión (Del Pino et al. 2004; Sundin y Nilsson 2002). Las branquias externas se encuentran conformadas por un soporte conectivo, cruzadas longitudinalmente por dos o más capilares, cubiertas por una bicapa delgada de epitelio (Gosner 1960; Brunelli et al. 2004).

Posteriormente se desarrollan las branquias internas de carácter persistente para reemplazar las branquias externas que se reabsorben (Brunelli et al. 2004; Warkentin 2002). Las branquias internas cumplen un papel en la regulación osmótica, el intercambio gaseoso y la alimentación por las células especializadas que posee (Brunelli et al. 2004). Se sabe poco sobre el desarrollo de branquias internas, los estudios describen el desarrollo, en larvas pre metamórficas, mostrando su capacidad de generar estructuras filamentosas ramificadas, con ramas terminales respiratorias (Brunelli et al. 2004; Minnich et al. 2002). La composición del epitelio de las branquias internas es representado por células presentes en los filtros branquiales, y células cúbicas superficiales de los mechones branquiales (Brunelli et al. 2004).

El estudio del sistema de la línea lateral en anuros se ha focalizado más en la distribución de las líneas laterales en larvas pre metamórficas, que en el desarrollo (Quinzio y Fabrezi 2014). Los estudios del desarrollo de la línea lateral en anfibios son restringidos y hasta ahora se han enfocado más en la rana *Xenopus laevis* y el axolote *Ambystoma mexicanum* (Smith et al. 1990; Pichon y Ghysen 2004). En anuros, la línea lateral está constituido por mecanoreceptores llamados neuromastos, los cuales están constituidos por células ciliadas sensoriales rodeadas por células de soporte y células del manto, todas incrustadas en la epidermis (Dijkgraaf 1963; Quinzio y Fabrezi 2014). Los cilios de las células ciliadas sensoriales se proyectan en una sustancia gelatinosa llamada cúpula y permiten receptar ondas en el agua estimulando la cápsula en la que está embebida el neuromasto dentro de la epidermis (Dijkgraaf 1963; Winklbauer y Hausen 1985; Quinzio y Fabrezi 2014).

La línea lateral se forma a partir de las placodas de la línea lateral, un grupo de células ectodermales que se desarrollan formando primordios, los cuales se alargan y migran dentro de la epidermis, dejando grupos de células que conformaran los neuromastos al diferenciarse. Mientras tanto, los axones del nervio de la línea lateral crecen junto con el primordio migratorio dejando un rastro de neuritas. Tras la diferenciación celular, los axones del nervio de la línea lateral proporcionan conexiones aferentes y eferentes con las células ciliadas sensoriales, permitiendo que los neuromastos puedan recibir estímulos en el agua (Winklbauer 1989).

Con el fin de describir el desarrollo embrionario de las branquias externas e internas, se realizó la descripción morfológica, morfométrica, inmunodetección de vimentina y, tinción en naranja de acridina y Nile blue. Para la descripción del desarrollo de la línea lateral se realizó la inmunodetección de las proteínas serotonina y vimentina. Para evaluar la presencia de

apoptosis durante la regresión branquial, se realizó una tinción en naranja de acridina, esta tinción se expresa en una fluorescencia verde y roja. La fluorescencia verde marca ADN celular, mientras que la roja marca lisosomas en etapas iniciales de apoptosis (Traganos y Darzynkiewicz 1994; Kasibhatla 2006; Liu et al. 2015). Para determinar las estructuras internas durante la formación de las branquias externas y el seguimiento de los neuritas durante el desarrollo de la línea lateral, se realizó la inmunodetección de la proteína vimentina, la cual tiene una expresión en células endoteliales de vasos sanguíneos, células gliales, fibroplastos, filamentos intermedios, axones y células neurales inmaduras (Chang et al. 2009; Del Pino y Medina 1998; Lau et al. 2017). Para determinar si existe acción serotoninérgica durante el desarrollo de la línea lateral, se realizó una inmunodetección de serotonina. Estudios anteriores han reportado que la serotonina está relacionada con actividades sensoriales y motoras en células paraneuronales (McLean y Sillar 2004). Estos análisis aportan en gran medida al mejor entendimiento del desarrollo de órganos adaptativos para la vida acuática al ser en su mayoría, moléculas no reportadas en el desarrollo de ranas.

El presente estudio busca dilucidar el desarrollo embrionario de las branquias y la línea lateral en *Epipedobates anthonyi* perteneciente de la familia Dendrobatidae, especialmente porque posee características distintivas durante etapas embrionarias y post-embrionarias como la ovoposición terrestre y el cuidado parental. Al eclosionar, sufren exposición al aire mientras las larvas son transportadas por el padre hacia una fuente de agua (Weygoldt 1987; Duellman y Trueb 1994). Las características antes mencionadas podrían influir en el desarrollo de órganos transitorios.

Para evaluar la presencia de la apoptosis durante la regresión branquial, se realiza una tinción en naranja de acridina, esta tinción se expresa en una fluorescencia verde y roja. La fluorescencia verde marca ADN celular, mientras que la roja marca lisosomas en etapas iniciales de apoptosis (Traganos y Darzynkiewicz 1994; Kasibhatla 2006; Liu et al. 2015). Para determinar las estructuras internas durante la formación de las branquias externas y el seguimiento de los neuritas durante el desarrollo de la línea lateral, se realiza la inmunodetección de la proteína vimentina, la cual tiene una expresión en células endoteliales de vasos sanguíneos, células gliales, fibroplastos, filamentos intermedios, axones y células neurales inmaduras (Chang et al. 2009; Del Pino y Medina 1998; Lau et al. 2017). Para determinar si existe acción serotoninérgica durante el desarrollo de la línea lateral, se realiza una inmunodetección de serotonina. Estudios anteriores han reportado que la serotonina está

relacionada con actividades sensoriales y motoras en células paraneuronales (McLean y Sillar 2004).

La descripción del desarrollo embrionario de órganos transitorios nos permite conocer el momento en el cual se desarrollan y la posible función que cumplen. En esta ocasión, el estudio de las branquias durante etapas embrionarias aporta los conocimientos de mecanismos de crecimiento y regresión de branquias, mecanismos hasta ahora desconocidos en Dendrobátidos. El estudio de la línea lateral en cambio, comprobara cuando y como se forma la línea lateral, permitiendo determinar desde que momento el embrión puede percibir estímulos, por la actividad serotoninérgica que muestra. Estos análisis aportan en gran medida al mejor entendimiento del desarrollo de órganos adaptativos para la vida acuática en Dendrobátidos al ser en su mayoría, moléculas no reportadas en el desarrollo de ranas y además, se comprueba el funcionamiento de nuevas metodologías útiles para próximos estudios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento y estadificación de los embriones.- Los embriones de *Epipedobates anthonyi* requeridos para este estudio, fueron donados por el proyecto "Balsa de los Sapos" de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. En el laboratorio cada postura fue mantenida durante el desarrollo embrionario a temperatura ambiente (18-24 °C) en cámaras húmedas, las cuales consisten en cajas Petri revestidas de papel absorbente y plástico humedecido con agua destilada. Para determinar los estadios *E. anthonyi* se usa la tabla del desarrollo descrita para *Epipedobates machalilla* (Del Pino et al. 2004).

Procesamiento y fijación de embriones.- Los embriones usados para la descripción del desarrollo branquial, fueron observados y manipulados en solución Steinberg 1x, para ser fotografiados en los distintos estadios. La fijación de los embriones para las inmunodetecciones de serotonina y vimentina fue en DENT's (80 % MeOH+20 % DMSO), en embriones entre el estadio 19 al 25. Para la fijación en DENT's primero se requiere retirar las capas de gelatina y la capa vitelina en Steinberg 1x, para luego gradualmente cambiar Steinberg 1x por la solución DENT's en porcentaje (30 %-60 %-100 %). Se incuba a 4 °C por un día, luego se reemplaza el fijativo con metanol 100 % y se almacena a -20 °C.

Tinción e inmunotinción.- Para describir la muerte celular en branquias externas se incubaron lo embriones previamente decorionados en 1 ml de solución 1x de naranja de acridina en Steinberg 1x durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó dos veces con Steinberg 1x y se tomaron fotografías en el microscopio Zeiss Axio Observer Z1 de luz transmitida que permitió ver la florescencia roja y verde característica de este tinte.

Para visualizar la regresión de branquias externas a la par de la formación de las branquias internas, se realizó tinción Nile blue. Los embriones decorionados se tiñeron en una solución acuosa de Nile blue al 0.001 % en Steinberg 1x durante 5 minutos. Posteriormente se realizaron dos lavados en Steinberg 1x y se tomaron fotos.

Para la inmunodetección de vimentina-serotonina se usaron embriones enteros fijados en DENT's. Se usaron los anticuerpos primarios monoclonales H5 para la inmunodetección de la proteína vimentina (Herman et al. 1993) , 5-HT (Frazer y Hensler 1999), para receptores de la serotonina y DAPI para la tinción de núcleos celulares (Kapuscinski 1995). Los anticuerpos secundarios usados fueron: anti-ratón IgG (H5) y anti-conejo IgG (5-HT). El procedimiento de la inmunotinción se describe en Kispert y Herrmann (1994) con las respectivas modificaciones de (Kuratani y Horigome 2000).

Morfometría y procesamiento de imágenes.- Para medir el crecimiento y decrecimiento diario de las branquias externas, se tomaron las medidas de las branquias de 10 embriones vivos decorionados, cultivados en Steinberg 1x en una caja Petri. Los embriones provenían de la misma postura y estadio al inicio del experimento. Las medidas fueron tomadas todos los días a las 15:00, a partir de la aparición del primer brote de branquia externa, hasta la regresión de las mismas.

Se usó el estereoscopio Olympus SZX16, con la cámara Olympus DP73 y el programa Cellsense standard para fotografías diariamente el crecimiento branquial de los embriones y las secciones embrionarias teñidas con Nile blue. Los embriones tratados en la tinción Naranja de acridina fueron fotografiados en el microscopio invertido Zeiss Axio Observer Z1, la cámara AxioCamMR5 y el programa Axiovision 4.6.3. Las fotografías de las inmunotinciones en cambio, fueron tomadas en el microscopio Nikon eclipse Ni, la cámara Mshot Ms60 y el programa Mshot Image Analisis System. Las imágenes posteriormente fueron editadas para realizar las figuras gracias a ImageJ, Adobe Photoshop CS6, y Adobe Illustrator.

RESULTADOS

Formación de las branquias externas durante el desarrollo embrionario.- El estudio describe el desarrollo de las branquias externas en *E.anthonyi* a partir del estadio 19 hasta el estadio 25, donde se completa la regresión de las branquias externas. La descripción del desarrollo se realizó a partir de fotos tomadas en los estadios antes mencionados, mientras que la descripción de la elongación de las branquias externas, se basa en las medidas de las branquias tomadas diariamente de 10 individuos diferentes, desde la aparición de las branquias, hasta su completa regresión, evento que tomó 9 días. El estadio 19 se caracteriza por el brote de las branquias externas anteriores (Figuras 1A y 1B) localizadas en el arco branquial 2 y 3. A partir del estadio 19 las branquias empiezan a ramificarse. En el estadio 20 llega a tener cuatro ramas secundarias y brotan las branquias posteriores. Luego, en el estadio 21, las branquias anteriores llegan a tener seis ramas secundarias y las posteriores una (Figura 1C). En el estadio 22 las branquias anteriores y posteriores tienen un alargamiento simultaneo (Figura 1D). En el estadio 23 las branquias anteriores y posteriores se elongan hasta tener su máxima extensión y ramificación (8 ramificaciones; Figura 1E). Finalmente, en el estadio 24 empieza la etapa de regresión de las branquias anterior y posterior del lado derecho (Figura 1F).

Para determinar el crecimiento de las branquias externas se tomaron medidas de las branquias anteriores Ba y posteriores Bp (Ba izquierda, Ba derecha, Bp izquierda, Bp derecha) de 10 embriones, desde la aparición de la yema branquial en estadio 19 (día 1) hasta la desaparición total de las branquias externas en el estadio 25 (día 9) (Figura 1G; Anexo 1;). Las branquias anteriores y posteriores presentan un crecimiento simultaneo progresivo hasta el cuarto día, representado por el estadio 23, en el que llegan a tener la mayor extensión durante el desarrollo, con aproximadamente 2 mm en las branquias anteriores. La regresión branquial ocurre después, en eventos independientes, pues el tiempo tomado para la regresión de branquias posteriores, anterior derecha y anterior izquierda, difiere. Las branquias externas posteriores decrecen simultáneamente en dos días; la branquia externa derecha toma 3 días y la branquia externa izquierda toma 5 días. La regresión de la branquia derecha ocurre más rápido en comparación a la izquierda debido a que no solo actúa la regresión de la branquia, como se observa en la (Figura 2B'), sino que el pliegue opercular interfiere en su regresión, ocultándola mientras el pliegue opercular cierra. Al cuantificar el tiempo requerido para la formación y regresión de branquias externas, se demostró que tanto las branquias externas posteriores y la anterior derecha, tardan más tiempo en desarrollarse, que en la regresión. La

branquia externa anterior izquierda persiste más tiempo y su regresión es lenta frente a las anteriores descritas, pues su formación toma menos tiempo que su regresión.

Regresión de branquias externas y formación de las branquias internas.- En el estudio se pudo observar que después de que las branquias externas llegan a su mayor extensión, empiezan inmediatamente a sufrir la regresión. En *E. anthonyi* se determinaron tres fases que ocurren a lo largo de la regresión branquial: La primera fase empieza con la rápida regresión de las branquias posteriores (a los 2 días de iniciar la regresión, Figura 1G), debido a su pequeño tamaño (Figura 1E, estadio 23). En la segunda fase, el pliegue opercular formado en el estadio 23 empieza a cerrarse desde el lado derecho hacia el lado izquierdo, provocando que se cubran las hendiduras branquiales y la branquia anterior derecha (Figura 2A'-2D'). Al mismo tiempo, la branquia anterior derecha se reabsorbe a los 3 días de iniciar la regresión (Figura 1G). En la tercera fase empieza la regresión de la branquia anterior izquierda, que termina cuando esta se internaliza en la cámara branquial, a los 5 días de iniciar la regresión, (Figura 1G), finalizando la breve aparición de las branquias externas.

Las branquias internas se desarrollan simultáneamente al crecimiento del pliegue opercular y a la regresión branquial externa. En el estadio 22 se observa las branquias internas como filamentos simples y lisos. Posteriormente en el estadio 23 las branquias internas forman dos hileras de filamentos por cada arco branquial. Las branquias internas son revestidas progresivamente hasta el estadio 25, por filtros branquiales que aumentan su volumen (Figura 2E-2H).

Muerte celular en branquias.- Con el fin de determinar la presencia de apoptosis durante la regresión de branquias externas, se procedió a marcar a los embriones *in vivo* con naranja de acridina. Para el experimento de naranja de acridina se usaron embriones de la misma familia Dendrobatidae, pero de la especie *Hyloxalus nexipus* por desabastecimiento de embriones *Epipedoates anthonyi*. Esta tinción se realizó a partir del estadio 22 hasta el estadio 25 (Figura 3). La naranja de acridina en el estadio 22 marcó las mismas células en florescencia verde y roja; sin embargo, la verde marco núcleos celulares, mientras que la roja marco pequeños cúmulos en el citoplasma (Figura 3A). En el estadio 23 no se diferenciaron las estructuras celulares, sin embargo, se pudo notar que las células con florescencia roja marcadas no coincidieron totalmente con las células en fluorescencia verde (Figura 3B). En el estadio 24 la marcación celular en fluorescencia verde fue baja e indefinida, en un pequeño grupo de células. En la florescencia roja se pudo diferenciar protuberancias marcadas en la superficie de las branquias externas dispersas en toda la branquia (Figura 3C). En el estadio 24 más

avanzado, donde casi finaliza la regresión de branquias externas, tanto la florescencia verde como roja marcó todas las células visibles. (Figura 3D). La naranja de acridina se mantuvo en las branquias externas hasta las últimas fases de regresión (Figura 3E). Se demostró que la apoptosis no solo actúa cuando las branquias regresan, sino también cuando se forman.

Marcador endotelial en branquias.- Se pudo evidenciar que el marcador endotelial, vimentina, se expresó en las branquias externas durante todos los estadios del desarrollo. En el estadio 19, la vimentina se expresó en los arcos branquiales y en el brote de las primeras branquias externas, en donde se detectó la expresión en células precursoras de los vasos branquiales (Figura 4F y 4F'). En el estadio 21, la vimentina se expresa en los vasos branquiales, en proceso de ramificación (Figura 4G y 4G'). La ramificación branquial se da cuando una rama empieza a tener una diferenciación de dos vasos branquiales, para luego separarse. En el estadio 22, la vimentina se expresa con mayor intensidad que en otros estadios, en las células que forman los vasos branquiales por los filamentos intermedios presentes en ellas (Figura 4H y 4H'). A partir del estadio 23 las branquias tienen una expresión de vimentina más débil principalmente en el tejido conectivo branquial (Figura 4I y 4I'). En el estadio 24 la vimentina se limita a expresarse en el epitelio de los filamentos branquiales (Figura 4J y 4J').

Expresión de vimentina en el desarrollo de la línea lateral.- A partir de la inmunotinción, que permitió conocer los patrones de expresión de la vimentina durante la formación de la línea lateral, se encontró que la vimentina se expresa en las neuritas que siguen al primordio de la línea lateral, justo antes del desarrollo de neuromastos (Figura 5). A continuación, se detalla la trayectoria que tuvieron las neuritas por la línea lateral en cada estadio, desde el 19 al 25. En el estadio 19 la vimentina no tuvo una expresión definida, relacionada con la línea lateral (Figura 5A). En el estadio 21 la vimentina se expresó en la línea lateral supraorbital, infraorbital, aortica y la línea lateral media (Figura 5B). En el estadio 22 la vimentina se expresó en las líneas descritas del estadio 21 pero se observó una mayor extensión de las mismas, además se expresó también en la línea lateral superior (Figura 5C). En el estadio 23 las líneas se elongan, tanto en la línea lateral media como en la superior, toman una desviación para empezar a desarrollarse hacia la parte dorsal. En este estadio se visualiza la formación de la línea lateral post orbital (Figura 6A). En el estadio 24 la línea lateral media llega hasta el final de la cola. En este estadio, la vimentina tiene una expresión en la línea lateral media ventral totalmente desarrollada (Figura 6B). En el estadio 25 la línea lateral superior llega al final de la cola y se visualizan las líneas anteriormente descritas

completamente desarrolladas, mientras que nuevas líneas se desarrollan, como la línea lateral aortica, anterior baja y posterior baja (Figura 6C). El proceso de desarrollo de la línea lateral que se propone en el estudio se puede entender de mejor manera a través del esquema en la Figura 7. Se observó que la vimentina se expresa con mayor intensidad en los estadios anteriores al desarrollo de los neuromastos (Figura 5; Figura 7A, Figura 7G), al desarrollarse los neuromastos la expresión de la vimentina disminuye y se empieza a restringir en la misma ubicación donde los neuromastos se desarrollan (Figura 6, Figura 7B-C).

Expresión de la serotonina en el desarrollo de la línea lateral.- La serotonina se expresó en la línea lateral, evento esperado por ser un órgano mecanoreceptor sensitivo. Sin embargo su expresión no se restringió a las etapas donde la línea lateral estaba totalmente desarrollada, si no que se expresó desde que los neuromastos empezaron a diferenciarse. La serotonina se expresó en células que forman el neuromasto, sin embargo, no se sabe con seguridad el tipo celular (células ciliadas sensoriales, células de soporte o células del manto). Lo que sí se puede apreciar es que la expresión de serotonina se concentra en la parte apical de las células que conforman el neuromasto, teniendo mayor contacto con la superficie externa. Su expresión en neuromastos tempranos y tardíos (Figura 7) fue distinta, los neuromastos tempranos tuvieron una baja expresión de serotonina en comparación con los neuromastos más desarrollados. El nivel de maduración de los neuromastos fue determinado por el número y tamaño de las células que conforman el neuromasto, en el estadio 23, por ejemplo, se vieron neuromastos muy poco diferenciados donde no se notaba con exactitud la estructura típica del neuromasto y la expresión de serotonina era muy leve (Figura 7G y 7H); los neuromastos más desarrollados se vieron en el estadio 25, en donde se notaba la estructura definida del neuromasto y una mayor expresión de serotonina (Figura 7M-7O); la expresión de serotonina permitió evidenciar que las células de los neuromastos más desarrollados tenían menor cantidad de células, pero fueron más grandes, y el aumento de la expresión de serotonina se restringió especialmente en la parte apical donde las células del neuromasto, está más en contacto con la superficie.

El patrón de expresión de la serotonina en la línea lateral formado por la expresión en neuromastos se evidencia a partir del estadio 23, en donde hay una expresión en la línea lateral supra orbital, infra orbital y media. Posteriormente en el estadio 24, la serotonina se expresó en las líneas descritas del estadio 23; y, adicionalmente en la línea lateral superior y ventral; en el estadio 25, la serotonina aumentó su expresión y marcó el patrón más

desarrollado de la línea lateral por la expresión de las líneas descritas del estadio 23 y 24, y adicionalmente, la línea lateral aortica, anterior baja, posterior baja y postorbital.

Desarrollo de la línea lateral en base a la expresión de vimentina y serotonina.- El desarrollo del sistema de la línea lateral basado en la expresión de la vimentina y serotonina se resume en la Figura 8.

DISCUSIÓN

Formación de las branquias externas durante el desarrollo embrionario.- Las branquias externas en *Epipedobates anthonyi* se desarrollaron en nueve días a partir de la aparición del primer brote branquial externo, el cual surge a partir de los arcos branquiales III y IV, correspondientes al par de branquias anteriores y posteriores al igual que *Epipedobates machalilla* (Del Pino et al. 2004) y a diferencia de *Xenopus laevis* y *Rana pipiens* donde se llegan a formar tres pares de branquias externas que surgen de los arcos branquiales III, IV, V (Millard y Adamson 1943; Michaels et al. 1971) o de *Rhinella arenarum* que llega formar 4 pares de branquias externas (Alonso 2003). La mayor elongación de branquias externas ocurre en el cuarto día y avanza la regresión hasta el noveno día. Tomando en cuenta que el desarrollo embrionario para esta especie es de 14 días, el desarrollo y la regresión branquial representan gran parte del periodo del desarrollo embrionario, a diferencia de *Bufo bufo*, *Rana dalmatina* en los que el desarrollo y regresión de las branquias externas toma menos de 6 días (Brunelli et al. 2004; Cambar y Marrot 1954; Cambar y Gipoloux 1956).

E. anthonyi posee branquias externas muy desarrolladas, llegando a tener elongación de aproximadamente 2 mm que equivale cerca del 50% de la longitud del cuerpo en estadio 23, una de las branquias más extensas con relación al cuerpo comparando con otros géneros como *Bufo*, *Xenopus*, *Elachistocleis*, *Leptodactylus* (Nokhbatolfoghahai y Downie 2008). El desarrollo de este tipo de branquias puede responder a la hipótesis que exponen Nokhbatolfoghahai y Downie (2008); Rogge y Warkentin (2008) quienes reportan un mayor desarrollo branquial en especies con eclosión tardía y entornos de incubación con oxígeno limitado. En este caso, *E. anthonyi* coincide por tener una eclosión tardía e incubación en la hojarasca (Duellman y Trueb 1994).

Regresión de branquias externas y formación de las branquias internas.- El reemplazo de las branquias externas involucradas en la respiración embrionaria requiere del desarrollo simultáneo de órganos que suplanten su actividad mientras completan su regresión, lo que corresponde al desarrollo de las branquias internas. Las branquias externas e internas difieren en funcionalidad y composición. Las branquias externas se restringen a colaborar con el intercambio gaseoso requerido para el desarrollo del embrión, pues al estar dentro del huevo, las branquias externas le permiten tener una mayor superficie de intercambio gaseoso en ambientes que pueden resultar hipóxicos por inundaciones (Rogge y Warkentin 2008; Warkentin 2002). La función de las branquias internas en cambio es mucho más amplia, pues participan en la alimentación, intercambio iónico y respiración (Viertel 1999), Estas requieren de una estructura y conformación celular más compleja (Brunelli et al. 2004; Nokhbatolfoghahai y Downie 2008) que las branquias externas. Las branquias externas aportan a la respiración embrionaria, mientras las branquias internas se están formando. La estructura de las branquias externas es menos compleja que las internas. Por lo tanto, es eficiente generar estructuras transitorias más simples como las branquias externas, pues permite la supervivencia del embrión al suplir la respiración embrionaria, y da tiempo a que una estructura más compleja, como las branquias internas, se desarrollen para reemplazarla (Alonso 2003; Rogge y Warkentin 2008; Warkentin 2002).

Muerte celular en branquias.- La tinción con naranja de acridina en este estudio demostró que la apoptosis es un proceso que participa en la regresión branquial y en la configuración celular. Los resultados corroboran la importancia de la apoptosis en la diferenciación embrionaria, la morfogénesis y la regresión de órganos transitorios, como lo han mencionado anteriores estudios (Zhang et al. 1997).

La tinción *in vivo* con naranja de acridina durante la regresión de branquias externas permitió ver un marcaje diferenciado entre los estadios, el cual coincidió con algunas de las etapas propias de los procesos apoptóticos descritos por Michaels et al. (1971); Wyllie (1987); Koseki et al. (1992) son, el aumento de lisosomas y la aparición de protuberancias. Se determina finalmente que la tinción *in vivo* con naranja de acridina es un procedimiento eficiente para evaluar la apoptosis durante el desarrollo branquial. Este es el primer estudio que usa naranja de acridina para estudiar la apoptosis durante la regresión branquial, tinte que es recomendable porque además puede ser contrastado con tinciones de otras estructuras presentes en las branquias externas.

Marcador endotelial en branquias.- La vimentina se expresó en las branquias externas durante toda su formación, teniendo una mayor expresión en estadios tempranos (19, 21, 22) en los que la vimentina se localizó en células progenitoras de vasos branquiales y posteriormente en las células que conforman vasos branquiales maduros, sin embargo, a partir del estadio 23 la expresión de vimentina fue más débil restringiendo su expresión en tejido conectivo y luego en el epitelio de filamentos branquiales. En base a los resultados se sugiere que la vimentina cumple un papel importante en el desarrollo de branquias externas, sin embargo, posteriormente la vimentina baja su expresión, por lo que al final, se restringe a expresarse en funciones estructurales como el epitelio del filamento branquial.

Mis resultados coinciden con los realizados en *R. arenarum*, especie en la cual se encontró que la vimentina durante el desarrollo branquial, tiene una mayor expresión en células en activa proliferación (Alonso 2003). Con relación a estadios más tempranos, donde aún no se forman las branquias externas se ha encontrado que la expresión de vimentina está relacionada en el desarrollo de branquias externas, como el estudio de Del Pino y Medina (1998) en donde, la vimentina se expresó en corrientes branquiales de células de la cresta neural craneal.

Expresión de la vimentina en el desarrollo de la línea lateral.- La expresión de la vimentina en la línea lateral en este estudio propone una forma efectiva de rastrear la migración de neuritas que acompañan el primordio de la línea lateral (Winklbauer 1989), pues el patrón de expresión formado mostró cómo se desarrollan las diferentes líneas que conforman el sistema de la línea lateral. La vimentina se expresa con mayor intensidad en los estadios anteriores al desarrollo de los neuromastos para luego restringir su expresión en la misma ubicación donde los neuromastos se desarrollan. Los resultados se pueden deber a que la vimentina se expresa en células neuronales inmaduras (Dent et al. 1989; Chang et al. 2009; Del Pino y Medina 1998) y precursores neuronales (Sakuragawa et al. 1996), por lo tanto, la maduración de las células neuronales podría explicar la disminución de la expresión de vimentina.

Algunos estudios han descrito la expresión de la vimentina en células gliales (Nakafuku y Nakamura 1995; Sakuragawa et al. 1996), por esta razón la vimentina que se expresa en los neuromastos, podría estar marcando las células precursoras gliales que conforman los neuromastos (López y Hudspeth 2005)

Expresión de serotonina en el desarrollo de la línea lateral.- Se pudo evidenciar la expresión de la serotonina en los neuromastos, la misma que fue aumentando a medida que el embrión maduraba hasta estar listo para eclosionar en el estadio 25. Este es el primer estudio que expone la expresión de serotonina en neuromastos durante el desarrollo de la línea lateral en Anuros; aunque Goniakowska et al. (1993) mencionan en su estudio que existe actividad serotoninérgica en la línea lateral de algunos peces, pudiendo ser este un rasgo primitivo conservado en algunos Anuros.

Estudios relacionados con la actividad serotoninérgica en el desarrollo embrionario como el de McLean y Sillar (2004) han sugerido que la serotonina está relacionada con la actividad motora de neuronas direccionadas con el nado ficticio de embriones antes de nacer, mientras que Ten et al. (2005) menciona que la mayor expresión de serotonina antes de la eclosión, se puede deber a los requerimientos sensoriales y motores que van a necesitar *Eleutherodactylus coqui* luego de la eclosión. En ambos estudios se evidencia que la expresión de serotonina aumenta en las etapas maduras del embrión, justo antes de eclosionar, lo cual coincide con los resultados de este estudio, por lo que se sugiere que el aumento de serotonina en la línea lateral en las últimas etapas del desarrollo embrionario se puede deber a una preparación del órgano para la gran cantidad de estímulos sensoriales que tendrá al momento de eclosionar y las rápidas respuestas motoras que necesitará ejercer.

CONCLUSIÓN

Se evidenció que las grandes branquias externas de *Epipedobates anthonyi*, tienen un crecimiento sincrónico y un decrecimiento asincrónico, presentan una estructura más simple que las internas, y procesos como la apoptosis reportados en otro dendrobátido, podrían representar mecanismos indispensables para la transición de branquias externas a internas. En los estudios realizados con la línea lateral en cambio, se demostró que las técnicas para rastrear la migración de neuritas y la actividad seratoninérgica mediante la inmunotinción de vimentina-serotonina fueron eficaces, comprobando que la migración de neuritas en *E. anthonyi* se presenta a partir del estadio 21 y la actividad seratoninérgica a partir del estadio 23. Estos resultados pueden corresponder al requerimiento de estímulos necesario para su vida acuática luego de la eclosión, sin embargo, para comprobarlo se requiere estudios que determinen el papel que cumplen las branquias y la línea lateral durante las fases del desarrollo embrionario y luego de la eclosión.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por los proyectos de investigación de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). Agradecemos inmensamente a la iniciativa Balsa de los Sapos por proveernos de las posturas, Universidad Politécnica Salesiana, por permitir el acceso al microscopio Nikon eclipse Ni, también fue muy importante el apoyo de Camila García Zurita y Daniela Zurita en el procesamiento de imágenes. A Edison Salazar, por el apoyo permanente en las diversas fases de la investigación y a mi familia que son el soporte emocional que ha permitido la finalización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso GD. 2003. Desarrollo y diferenciación de las branquias externas e internas en embriones y larvas de *Bufo arenarum* : análisis descriptivo y experimental. Universidad de Buenos Aires.

Brunelli E, Perrotta E, Tripepi S. 2004. Ultrastructure and development of the gills in *Rana dalmatina* (Amphibia, Anura). Zoomorphology. 123(4):203-211.

Cambar R, Marrot B. 1954. Table chronologique du développement de la grenouille agile (*Rana dalmatina* Bon.). Bulletin biologique de la France et de la Belgique. 88:168-177.

Cambar R, Gipouloux J. 1956. Table chronologique du développement embryonnaire et larvaire du crapaud commun: Bufo bufo L. Bulletin biologique de la France et de la Belgique. 90: 198-217.

Chang L, Barlan K, Chou Y-H, Grin B, Lakonishok M, Serpinskaya AS, Shumaker DK, Herrmann H, Gelfand VI, Goldman RD. 2009. The dynamic properties of intermediate filaments during organelle transport. Journal of cell science. 122(Pt 16):2914-23.

Del Pino E, Medina A. 1998. Neural Development in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. International Journal of Developmental Biology. 42(5), 723-731.

Del Pino EM, Avila M-E, Perez OD, Benitez M-S, Alarcon I, Noboa V, Moya IM. 2004. Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. International Journal of Development Biology. 48(7):663-670.

Dent JA, Polson AG, Klymkowsky MW. 1989. A whole-mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in *Xenopus*. Development. 105(1).

Dijkgraaf S. 1963. The functioning and significance of the lateral-line organs. Biological Reviews Cambridge Philosophical Society. 38:51-105.

Duellman WE, Trueb L. 1994. Biology of amphibians. Johns Hopkins University Press.

Flickinger, R. 1957. The relation between yolk utilization and differentiation in the frog embryo. The American Naturalist. 91(861):373-379.

Frazer A, Hensler J. 1999. Chapter 13: Serotonin Receptors. Basic Neurochemistry Molecular, Cellular, and Medical Aspects. 263-292

Goniakowska L, Zaccone G, Fasulo S. 1993. Immunocytochemistry and ultrastructure of the solitary neuroepithelial cells in the gills of the neotenic tiger salamander *Ambystoma tigrinum* (Urodela, Amphibia). European archives of biology. 104(1):45-50.

Gosner KL. 1960. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. Herpetologica. 16(3): 183-190

Herman J -P, Victor JC, Sanes JR. 1993. Developmentally regulated and spatially restricted antigens of radial glial cells. Developmental Dynamics. 197(4):307-318.

Jonz MG, Nurse CA. 2006. Ontogenesis of oxygen chemoreception in aquatic vertebrates. Respiratory physiology & neurobiology . 154(1-2):139-152.

Kapuscinski J. 1995. DAPI: A DMA-Specific fluorescent probe. Biotechnic & Histochemistry. 70(5):220-233.

Kasibhatla S. 2006. Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. Cold Spring Harbor Protocols. 2006(21)

Kispert A, Herrmann BG. 1994. Immunohistochemical Analysis of the Brachyury Protein in Wild-Type and Mutant Mouse Embryos. Development Biology. 161(1):179-193.

Koseki C, Herzlinger D, Al-Awqati Q. 1992. Apoptosis in metanephric development. The Journal of Cell Biology. 119(5):1327-1333.

Kuratani S, Horigome N. 2000. Developmental morphology of branchiomeric nerves in a cat shark, *Scyliorhinus torazame*, with special reference to rhombomeres, cephalic mesoderm, and distribution patterns of cephalic crest cells. Zoological Science. 17(7):893-909.

Lau M, Li J, Cline HT. 2017. In Vivo Analysis of the Neurovascular Niche in the Developing Xenopus Brain. eNeuro. 4(4).

Liu K, Liu P cheng, Liu R, Wu X. 2015. Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. Medical science monitor basic research. 21:15-20.

López S, Hudspeth H. 2005. Supernumerary neuromasts in the posterior lateral line of zebrafish lacking peripheral glia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102(5):1496-1501.

McLean L, Sillar T. 2004. Divergent actions of serotonin receptor activation during fictive

swimming in frog embryos. Journal of Comparative Physiology A. 190(5):391-402.

Michaels JE, Albright JT, Patt DI. 1971. Fine structural observations on cell death in the epidermis of the external gills of the larval frog, *Rana pipiens*. American Journal of Anatomy. 132(3):301-317.

Millard N, Adamson RS. 1943. The development of the arterial system of *Xenopus laevis*, including experiments on the destruction of the larval aortic arches. Transactions of the Royal Society of South Africa. 30(3):217-234.

Minnich B, Bartel H, Lametschwandtner A. 2002. How a Highly Complex Three-Dimensional Network of Blood Vessels Regresses: The Gill Blood Vascular System of Tadpoles of Xenopus during Metamorphosis. A SEM Study on Microvascular Corrosion Casts. Microvascular Research. 64(3):425-437.

Nakafuku M, Nakamura S. 1995. Establishment and characterization of a multipotential neural cell line that can conditionally generate neurons , astrocytes , and oligodendrocytes in vitro. Journal of Neuroscience Research. 168:153-168.

Nokhbatolfoghahai M, Downie JR. 2008. The external gills of anuran amphibians: Comparative morphology and ultrastructure. Journal of Morphology. 269(10):1197-1213.

Pichon F, Ghysen A. 2004. Evolution of posterior lateral line development in fish and amphibians. Evolution & development. 193:187-193.

Quinzio S, Fabrezi M. 2014. The lateral line system in anuran tadpoles: Neuromast morphology, arrangement, and innervation. The Anatomical Record. 297(8):1508-1522.

Rogge JR, Warkentin KM. 2008. External gills and adaptive embryo behavior facilitate synchronous development and hatching plasticity under respiratory constraint. Journal of Experimental Biology :3627-3635.

Sakuragawa N, Thangavel R, Masashi M, Hirasawa M, Kamo I. 1996. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. Neuroscience Letters. 209:9-12.

Saltys HA, Jonz MG, Nurse CA. 2006. Comparative study of gill neuroepithelial cells and their innervation in teleosts and *Xenopus* tadpoles. Cell Tissue Res. 323(1):1-10.

Smith SC, Lannoo MJ, Armstrong JB. 1990. Development of the mechanoreceptive lateral-

line system in the axolotl: placode specification, guidance of migration, and the origin of neuromast polarity. Anatomy and Embryology (Berl). 182(2):171-180.

Sundin L, Nilsson S. 2002. Branchial innervation. Journal of Experimental Zoology. 293(3):232-248.

Ten GR, ,Jermakowicz WJ, Chinn AF, Summers CH. 2005. Ontogeny of central serotonergic neurons in the directly developing frog , Eleutherodactylus coqui. Anatomy and embryology. 210(3) :221-233.

Traganos F, Darzynkiewicz Z. 1994. Lysosomal Proton Pump Activity: Supravital Cell Staining with Acridine Orange Differentiates Leukocyte Subpopulations. In Methods Cell Biology. 41(C):185-194.

Uchiyama M, Yoshizawa H. 1992. Salinity tolerance and structure of external and internal gills in tadpoles of the crab-eating frog, *Rana cancrivora*. Cell and Tissue Research. 267(1):35-44.

Viertel B. 1999. Salt tolerance of *Rana temporaria*: Spawning site selection and survival during embryonic development (Amphibia, Anura). Amphibia- Reptilia. 20(2):161-171.

Warkentin KM. 2002. Hatching timing, oxygen availability, and external gill regression in the tree frog, *Agalychnis callidryas*. Physiol Biochem Zool. 75(2):155-164.

Weygoldt P. 1987. Evolution of parental care in dart poison frogs (Amphibia: Anura: Dendrobatidae). Journal of Zoological Systematics Evolutionary Research. 25(1):51-67.

Winklbauer R. 1989. Development of the lateral line system in *Xenopus*. Progress in Neurobiology. 32(3):181-206.

Winklbauer R, Hausen P. 1985. Development of the lateral line system in *Xenopus laevis* IV . Pattern formation in the supraorbital system.Development 207:193-207.

Wyllie AH. 1987. Apoptosis: Cell death under homeostatic control. In Mechanisms and Models in Toxicology. 60S:3-10.

Zhang Q, Ahuja HS, Zakeri ZF, Wolgemuth DJ. 1997. Cyclin-dependent kinase 5 is associated with apoptotic cell death during development and tissue remodeling. Developmental Biology. 183(2):222-233.

FIGURAS

Figura 1.

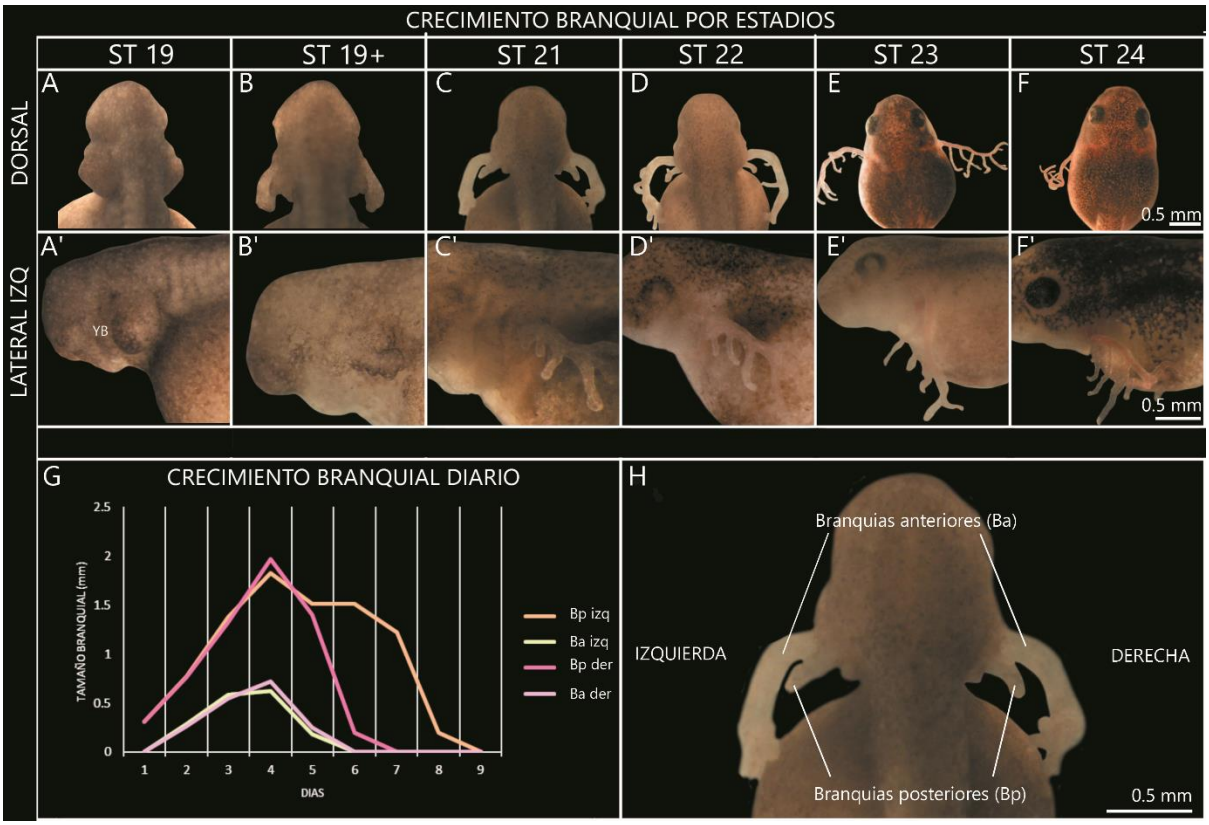


Figura 1. Formación de branquias externas durante el desarrollo embrionario en *E. anthonyi*. (A-F') elongación y ramificación de las branquias externas de vista dorsal y lateral izquierda. (A, A') aparición de la yema branquial (YB) del estadio 19. (B-B') detalle del brote del primer de branquias externas en el estadio 19 más avanzado. (C-C') Ramificación de las branquias anteriores y posteriores en el estadio21. (D, D') elongación de las ramificaciones de las branquias anteriores y posteriores. (E, E') detalle de las branquias en su etapa de mayor elongación. (F, F') regresión de branquias externas del lado derecho. (G) Crecimiento branquial diario en un gráfico que muestras la media de las medidas branquiales de 10 embriones a partir de la aparición de la yema branquial (día 1) hasta la reabsorción total de las branquias (día 9). **(C)** Diagrama dorsal de la disposición de branquias externas anteriores (Ba), y branquias externas posteriores (Bp).

Figura 2.

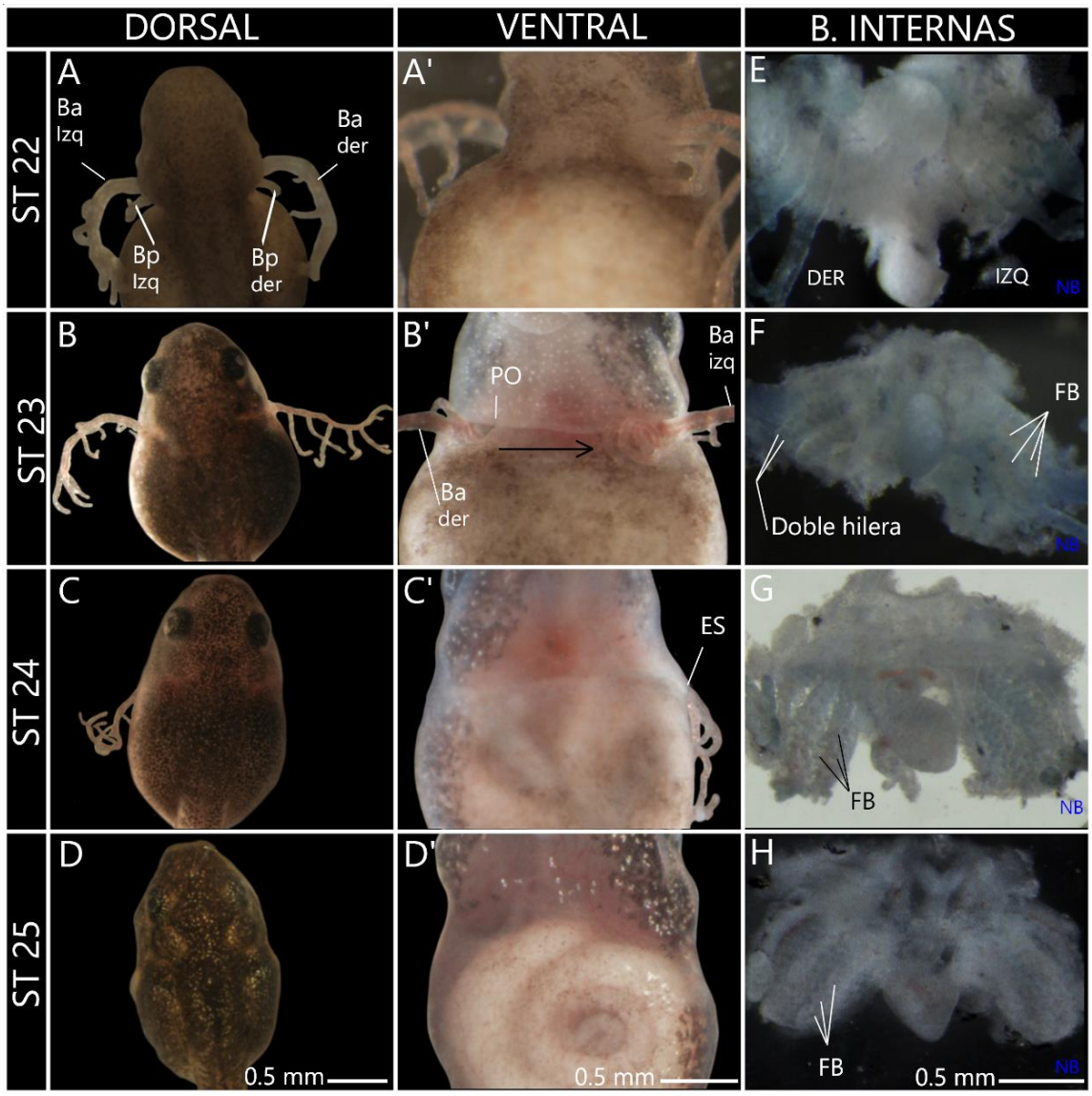


Figura 2. Transitoriedad y reemplazo de branquias externas por branquias internas en *E. anthonyi*. (A-D) Vista dorsal de embriones en etapa de elongación y regresión de branquias externas anteriores (Ba) y posteriores (Bp). (A', D') Desarrollo y cierre pliegue opercular (PO) durante la regresión de branquias externas en vista ventral de los embriones. (E, H) Desarrollo de branquias internas teñidas en Nile blue (NB) durante la regresión de branquias externas. La regresión de branquias externas empieza en el estadio 23 (B') donde el PO se forma y empieza a cerrarse en dirección derecha-izquierda (flecha), cubriendo la branquias derecha. Posteriormente en el estadio 24 (C') la branquia derecha ha sido cubierta totalmente por el PO y la branquia izquierda empieza su regresión por el por el espiráculo (ES), el cual se cerrara cuando se haya completado la regresión en el estadio 25 (D'), estadio que debe tener formadas las branquias internas importantes para la supervivencia en la vida

acuática como renacuajo. El desarrollo de branquias internas se da a la par de la regresión branquial, a partir del estadio 23 (F-H) se empiezan a desarrollar una doble hilera por cada arco branquial, en donde se forman filamentos branquiales (FB).

Figura 3.

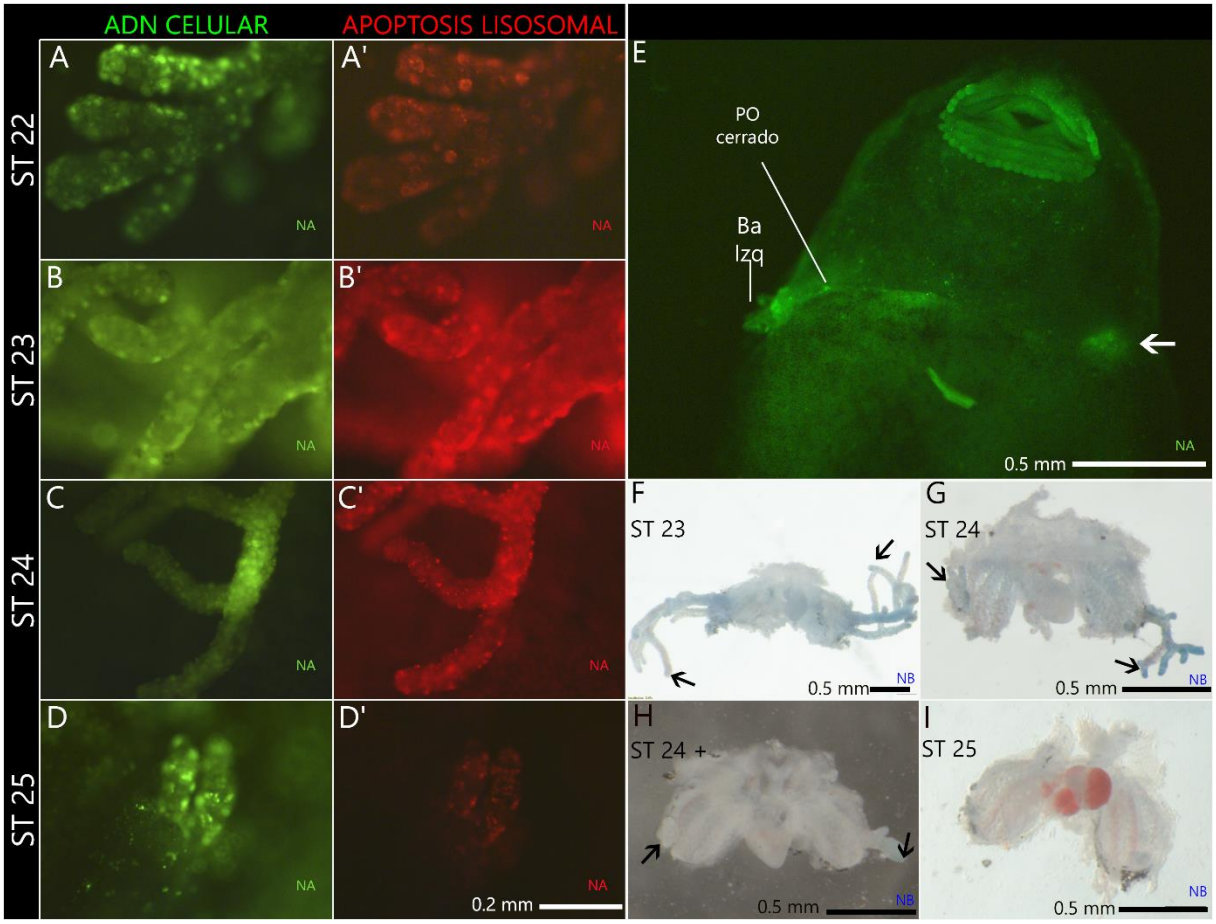


Figura 3. Apoptosis durante la regresión de branquias externas. (A-D') Branquias teñidas en Naranja de acridina durante la regresión branquial en fluorescencia verde y roja que representa ADN celular y apoptosis lisosomal. (E) Vista ventral del embrión teñido en Naranja de acridina que muestra el estado de regresión de la branquia derecha (flecha) al haber finalizado el cierre del pliegue opercular (PO). (F-I) Regresión de las branquias externas teñidas con Nile blue (NB) señaladas con flechas en relación al desarrollo de branquias internas desde el estadio 23 al 25.

Figura 4.

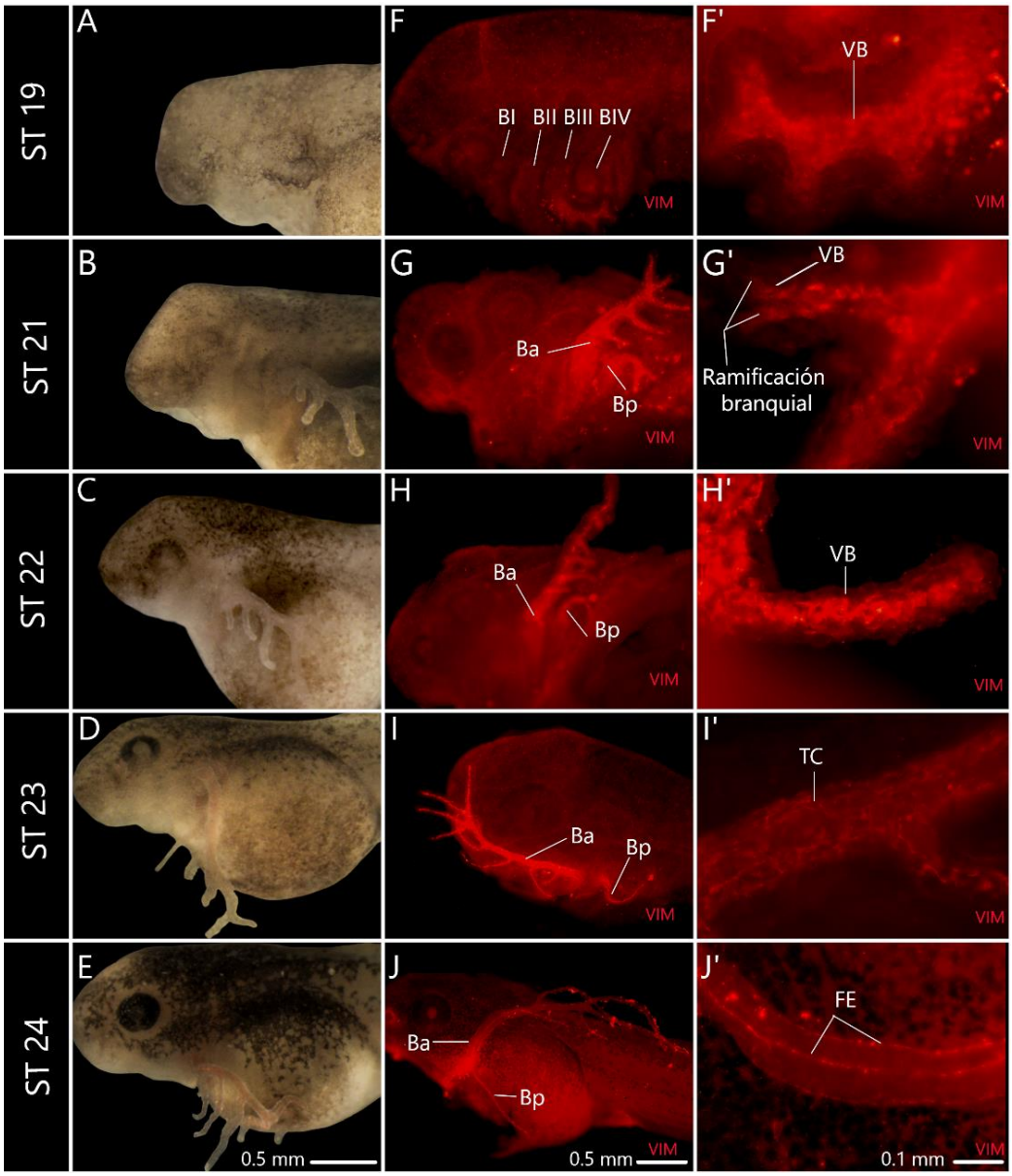


Figura 4. Expresión de la vimentina durante el desarrollo embrionario de las branquias externas de *E. anthonyi*. (A-E) vista externa del desarrollo branquial del lado izquierdo. (F-J) Vista externa del desarrollo branquial inmunoteñido en vimentina de la branquia anterior (Bp) y posterior (Bp) a partir del arco branquial 3 y 4 (BIII, BIV). (F'-J') Acercamiento de las branquias inmunoteñidas en vimentina donde se observa la expresión en células precursoras del vaso branquial (VB). (F') proceso de ramificación branquial demostrada por la tinción de los vasos branquiales independientes. (I') tinción de tejido conectivo (TC). (J')Expresión de vimentina en el filamento epitelial de las branquias (FE).

Figura 5.

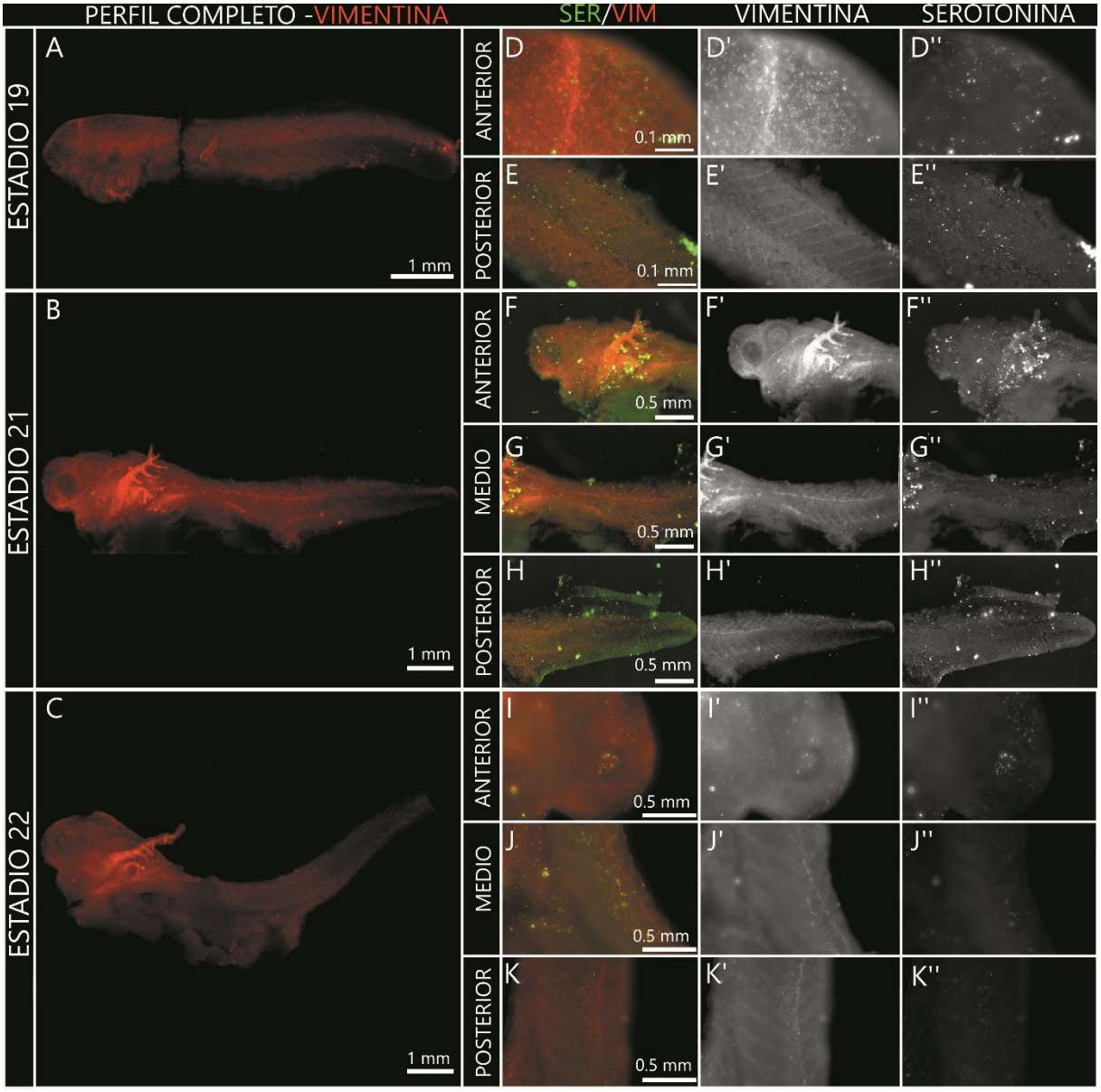


Figura 5. Expresión de vimentina y serotonina durante estadios tempranos del desarrollo de la línea lateral en *E. anthonyi.* (A, B, C) vista lateral izquierda de los patrones de expresión de la vimentina en embriones completos sin yema del estadio 19, 21, 22. (D-K") acercamiento de la parte anterior y posterior y media de los embriones inmunoteñidos en serotonina-vimentina (D-K), solo vimentina (D'-K'), y solo serotonina (D"-K"). En los estadios 19, 21, 22 del desarrollo de la línea lateral, la serotonina no tiene una expresión especifica (D'-K'). A partir del estadio 21 La vimentina presenta una expresión relacionada a la línea lateral, la cual se expande en el estadio 22 (I', J', K'). (F', G', H').

Figura 6.

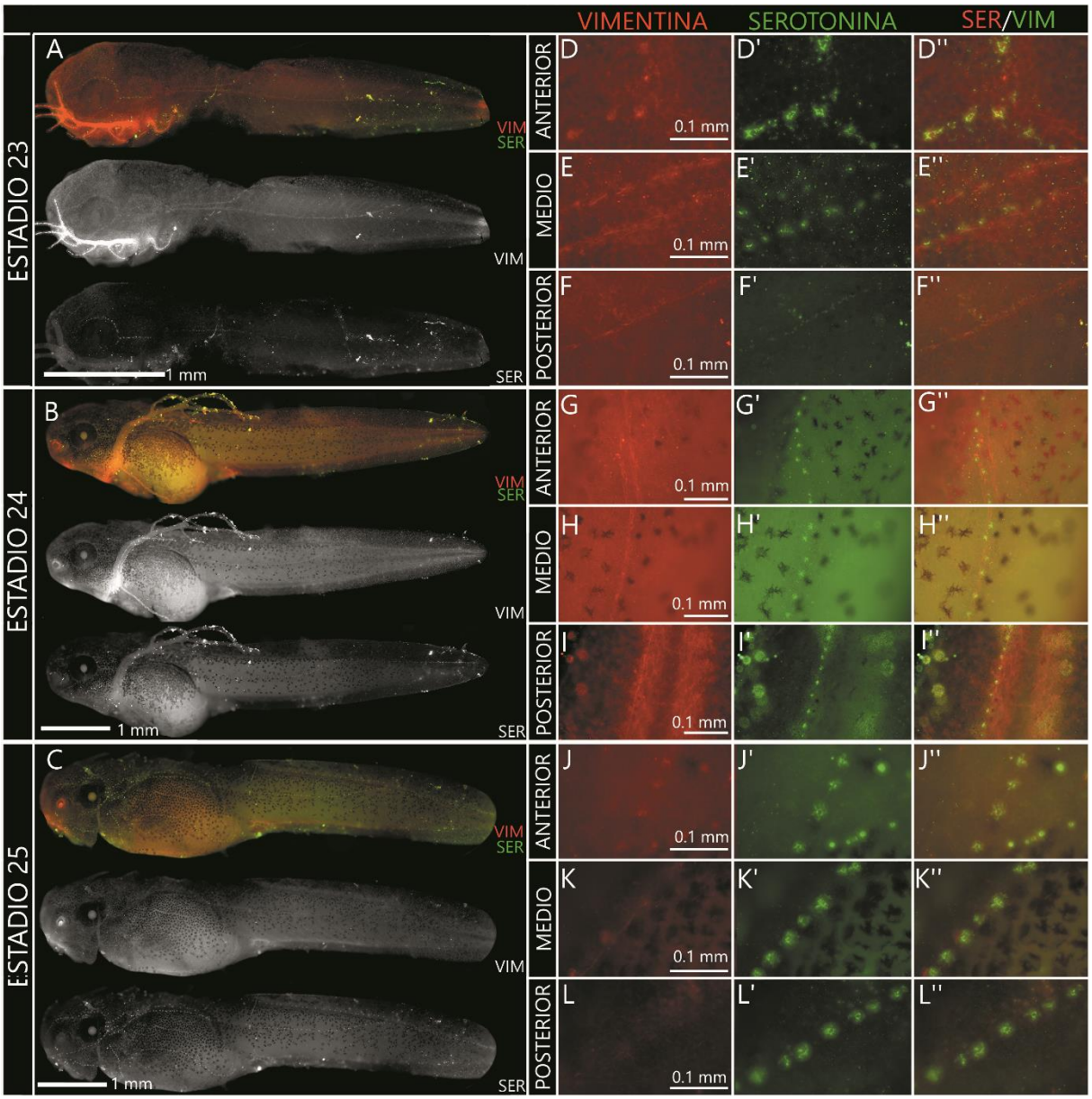


Figura 6. Expresión de vimentina y serotonina durante estadios tardíos del desarrollo de la línea lateral en *E. anthonyi*. (A, E, I) vista lateral izquierda de los patrones de expresión de la vimentina y serotonina en embriones completos del estadio 23, 24, 25. (D-L'') acercamiento de la parte anterior y posterior y media de los embriones inmunoteñidos en vimentina (D-L); serotonina (D'-L'), y serotonina- vimentina (D''-L'').En los estadios 23 y 24 del desarrollo de la línea lateral la vimentina tiene un patrón de expresión más desarrollado que la serotonina(A,B).En el estadio 23 la vimentina se expresa en la línea lateral en la parte anterior, media y posterior (D,E,F), mientras que la serotonina se expresa en los neuromastos que conforman la línea lateral con mayor intensidad en la parte anterior que en la media(D',E').en la parte posterior de la cola en cambio la serotonina no se expresa

específicamente (F').A partir del estadio 21 la expresión de vimentina y la serotonina empiezan a tener el mismo patrón debido al desarrollo de los neuromastos de la línea lateral (G"-I"'). En el estadio 25 el patrón de expresión de la serotonina es más intensa que la vimentina, los neuromastos muestran una expresión de serotonina mayor, al estar más desarrollados en toda la línea lateral (J, L'').

Figura 7.

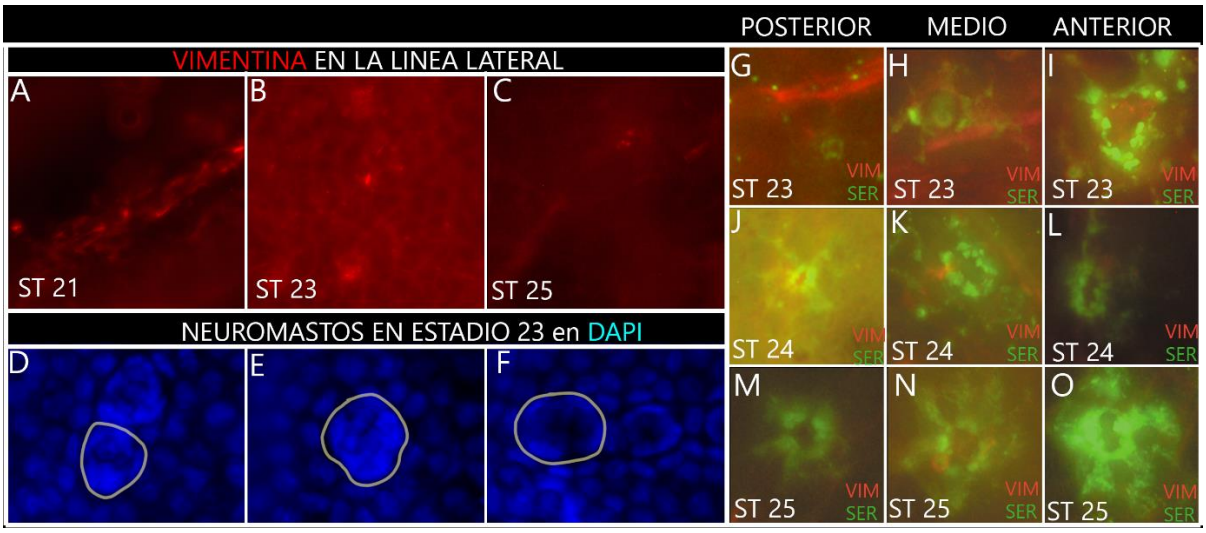


Figura 7. Expresión de vimentina y serotonina en el desarrollo de los neuromastos en *E. anthonyi*. (A-C) expresión diferenciada de la vimentina en la parte posterior del embrión en los estadios (21, 22, 25)(D-F) expresión de DAPI en neuromastos con distinto nivel de maduración en el estadio 23. (G-O) Comparación de neuromastos de la parte posterior, medio y anterior de los embriones en estadio 23, 24, 25 en inmunodetección de serotonina-vimentina.

Figura 8.

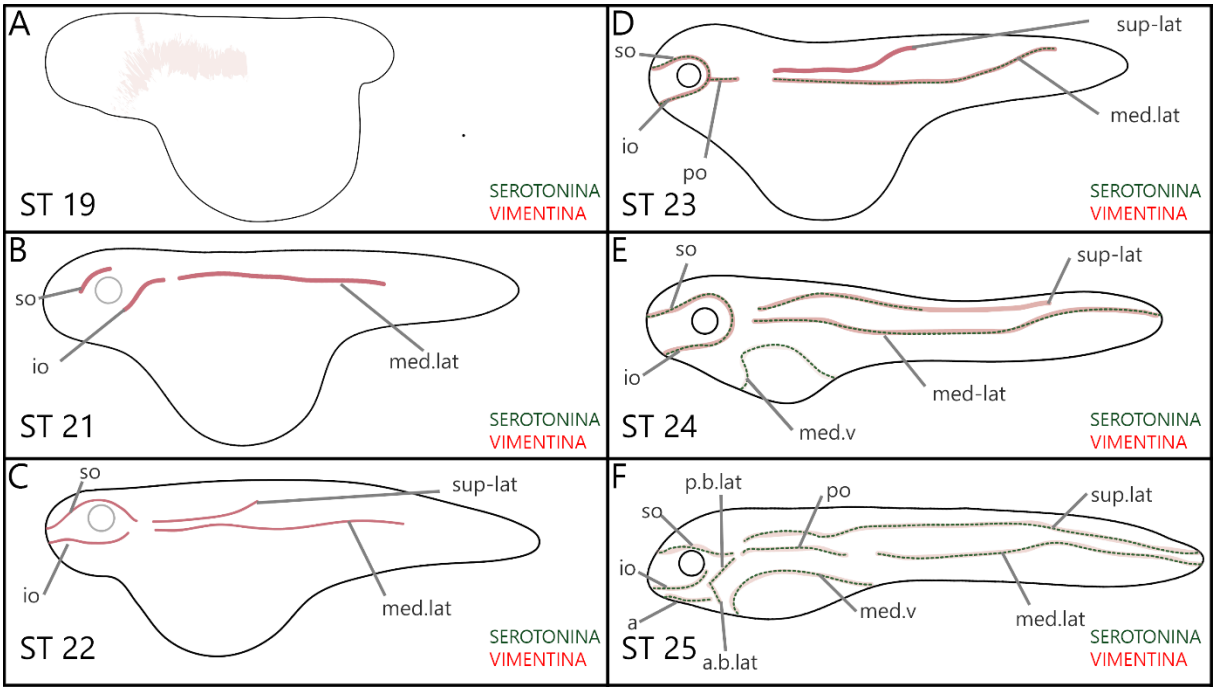


Figura 8. Patrón de expresión de vimentina y serotonina en la formación de la línea lateral en *E. anthonyi*. (A-F) Diagramas ilustrados en base al patrón de expresión de los anticuerpos serotonina y vimentina en los estadios 19, 21, 22, 23, 24, 25 con la descripción del desarrollo de cada línea lateral sugerida basada (Winklbauer 1989b)El desarrollo de la línea lateral empieza con la formación de placodas de la línea lateral, seguido de la formación del canal de la línea lateral, representado por las líneas de vimentina (ST 21- ST 25). Luego se forma una línea lateral de primordio por alargamiento y empieza la formación de los neuromastos que se evidencia en (ST 23- ST25) por la línea punteada de serotonina.so, supraorbital; io, infraorbital; mad.lat, línea lateral media; sup.lat, línea lateral superior; po, línea lateral post-orbital; med.v, línea media ventral; a, línea aortica; a.v.lat, línea anterior baja lateral; p.b.lat, línea posterior baja lateral.

Anexo 1. Medias y tasa de crecimiento en medidas tomadas diariamente de las branquias externas durante la elongación branquial (Ba, branquia anterior; Bp, branquia posterior).

Media de medidas de branquias externas por día

DIA	Ba izq	Bp izq	Ba der	Bp der
1	0.31	0.00	0.31	0.00
2	0.77	0.28	0.77	0.26
3	1.38	0.59	1.33	0.55
4	1.83	0.63	1.97	0.72
5	1.51	0.18	1.40	0.25
6	1.51	-	0.19	-
7	1.22	-	-	-
8	0.19	-	-	-
9	-	-	-	-

Tasa de crecimiento diario de branquias externas

DIA	Ba izq	Bp izq	Ba der	Bp der
1	151.54	-	146.95	-
2	78.71	106.82	73.47	110.13
3	32.32	6.83	47.97	30.85
4	-17.09	-71.25	-28.75	-65.88
5	-0.13	-100.00	-86.14	-100.00
6	-19.05	-	-100.00	-
7	-84.15	-	-	-
8	-100.00	-	-	-
9	-	-	-	-