PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Desarrollo normal en *Epipedobates anthonyi* e *Hyloxalus nexipus* (Dendrobatidae) en base al desarrollo condrocraneal

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

EMILIO ANDREE ZAMBRANO GOMEZ

Quito, 2023

Quito, 27 de febrero de 2023
OFICIO: AR-2023-12

Mtr. Álvaro Barragán
Director
Escuela de C. Biológicas
Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Presente.

De mis consideraciones:

Yo, Andrés Romero-Carvajal, director de la disertación intitulada "**Desarrollo normal en *Epipedobates anthonyi* e *Hyloxalus nexipus* (Dendrobatidae) en base al desarrollo condrocraneal**" de Emilio Andree Zambrano Gomez, certifico la culminación de trabajo de titulaciónen formato TESIS y tengo a bien recomendar los nombres de los siguientes colegas como miembros del comité lector:

1. Dr. Santiago Ron
2. Dr. Andrés Merino Viteri

Atentamente,

Andrés Romero-Carvajal, Ph.D.
Laboratorio de Biología del Desarrollo
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Teléfono: 2 99 17 00 ext. 1280
maromero@puce.edu.ec

A Dios y a mi familia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a mis padres por su amor y apoyo incondicional. A mis hermanos, por su compañía y comprensión.

A mis abuelas, por ser como madres para mí y brindarme todo su cariño.

Estoy muy agradecido con el Doctor Andrés Romero-Carvajal, quien me ha abierto las puertas de su laboratorio y ha sido un excelente guía durante mi período como estudiante.

Agradezco a mis amigos, quienes han sido soporte emocional cuando más lo he necesitado.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN IX
2. ABSTRACT X
3. INTRODUCCIÓN XI
4. OBJETIVOS XIV
4.1. OBJETIVO GENERAL XIV
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS XIV
5. MÉTODOS XV
5.1. Obtención de los embriones XV
5.2. Fijación de embriones: XV
5.3. Tinción de Hueso y Cartílago XVI
5.4. Observación y análisis de datos XVII
6. RESULTADOS XVIII
6.1. Desarrollo de Epipedobates anthonyi XVIII
6.1.1. Cartílago infrarostral XVIII
6.1.2. Cartílago suprarostral XVIII
6.1.3. Cartílago de Meckel XVIII
6.1.4. Palatocuadrado XVIII
6.1.5. Ceratohyal XIX
6.1.6. Cesta branquial XIX
6.2. Desarrollo de Hyloxalus nexipus XX
6.2.1. Cartílago infrarostral XX
6.2.2. Cartílago suprarostral XX
6.2.3. Cartílago de Meckel XX
6.2.4. Palatocuadrado XX
6.2.5. Ceratohyal XX
6.2.6. Cesta branquial XXI
7. DISCUSIÓN XXI
8. CONCLUSIONES XXIII
9. REFERENCIAS XXIII
10. FIGURAS XXVI
11. TABLAS XXX

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo del condrocráneo desde estadio 23 al 25 en *E. anthonyi*.....XXVI
Figura 2. Desarrollo del condrocráneo desde estadio 23 al 25 en *H. nexipus*.....XXVII
Figura 3. Embriones *E. anthonyi*.....XXVIII
Figura 4. Embriones *H. nexipus*.....XXIX

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia del desarrollo cartilaginoso en *Epipedobates anthonyi* XXX
Tabla 2. Secuencia del desarrollo cartilaginoso en *Hyloxalus nexipus*.....XXXI

Desarrollo normal en *Epipedobates anthonyi* e *Hyloxalus nexipus* (Dendrobatidae) en base al desarrollo condrocraneal

Normal development in *Epipedobates anthonyi* and *Hyloxalus nexipus* (Dendrobatidae) based on chondrocranial development.

Autores: Emilio Zambrano Gomez[1]* y Andrés Romero Carvajal[1]**

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

*emilioandree.97@gmail.com
**maromero@puce.edu.ec

1. RESUMEN

Hyloxalus nexipus y *Epipedobates anthonyi* son especies de la familia Dendrobatidae nativas de Ecuador de las cuales se conoce poco acerca de su desarrollo embrionario. Actualmente se determina los estadios larvarios utilizando principalmente características externas y no se conoce el desarrollo de los huesos del cráneo. En el presente trabajo se describe el desarrollo del condrocráneo en *H. nexipus* y *E. anthonyi* con sus figuras correspondientes, asignando etiquetas para cada estadio analizado. Para ello se utilizó Alcian Blue y Alizarin para teñir cartílago y hueso respectivamente y se procedió a fotografiar los individuos diafanizados. Se encontró que existen ligeras variaciones entre *H. nexipus* y *E. anthonyi* en cuanto al inicio del desarrollo de ciertas estructuras del condrocráneo. Los eventos del desarrollo craneal entre ambas especies de dendrobátidos analizadas tienen ligeras diferencias. El presente estudio de las fases larvarias trabajadas es de utilidad para documentar la variación temporal existente en el desarrollo del condrocráneo entre dendrobátidos y comparar con las secuencias de desarrollo observadas en anuros basales.

PALABRAS CLAVE: Anura, Dendrobatidae, condrocráneo, cartílago

2. ABSTRACT

Hyloxalus nexipus and *Epipedobates anthonyi* are species of the family Dendrobatidae native to Ecuador of which little is known about their embryonic development. Currently, the larval stages are determined using mainly external characteristics and the development of the skull bones is not known. The present work describes the development of the chondrocranium in *H. nexipus* and *E. anthonyi* with their corresponding figures, assigning labels for each stage analyzed. Alcian Blue and Alizarin were used to stain cartilage and bone, respectively, and the diaphanized individuals were photographed. It was found that there are slight variations between *H. nexipus* and *E. Anthonyi* in terms of the onset of development of certain chondrocranial structures. The events of cranial development between the two dendrobatid species analyzed have slight differences. The present study of the larval stages worked is useful to document the temporal variation in chondrocranial development between dendrobatids and to compare with developmental sequences observed in basal anurans.

KEY WORDS: Anura, Dendrobatidae, chondrocranium, cartilage

3. INTRODUCCIÓN

La familia Dendrobatidae está constituida por 12 géneros que contienen más de 300 especies, de las cuales 48 son nativas de Ecuador (Myers et al., 2023). La mayoría de sus especies son diurnas y depositan huevos terrestres los cuales al eclosionar son transportados por uno de los padres, usualmente el macho, hacia una fuente agua cercana para que completen su desarrollo larvario (Wells, 2007). La mayoría de las ranas venenosas pertenecientes a la familia Dendrobatidae obtienen las toxinas de su piel a partir de su dieta, basada principalmente en pequeños artrópodos que liberan alcaloides (Santos et al., 2016).

Epipedobates anthonyi, es una especie de tamaño pequeño que se caracteriza por tener piel lisa en el dorso y flancos, hocico deprimido, ojos pequeños en comparación de su cuerpo y una cabeza igual de ancha que el mismo (Coloma et al., 2022). *E. anthonyi* posee cuidado parental, siendo el macho el responsable de las posturas, humedeciéndolas con orina y protegiéndola del ataque de sus congéneres (Larrea & del Pino, 2011). En Ecuador esta rana se encuentra distribuida al occidente de la cordillera de los Andes en las provincias de El Oro, Azuay y Loja y su rango altitudinal va de los 153 a los 1800 metros sobre el nivel del mar (Coloma et al., 2022).

Por otro lado, *Hyloxalus nexipus* es una rana pequeña de color negro verdoso en la zona dorsal y blanco con reflección verdosa en la zona ventral. Al igual que *E. anthonyi,* sus puestas son terrestres y solo son recogidas para ser transportadas a una fuente de agua cercana (Schulte & Mayer, 2017). Puede ser encontrada en la provincia de Morona Santiago al sureste de la cordillera de los Andes y su rango altitudinal va desde los 500 a los 1500 m sobre el nivel del mar (Ortiz et al., 2022).

En los anuros, la metamorfosis consiste en la transformación de larva de agua dulce a una forma adulta semiterrestre, lo cual implica un complejo proceso con cambios fisiológicos e histológicos en el individuo como la absorción de la cola embrionaria, la cual es reemplazada por las extremidades como estructuras de locomoción (McDiarmid

& Altig, 1999). De igual manera, dicho proceso conlleva el desarrollo de glándulas multicelulares en la piel, cambio en la dieta de herbívora a carnívora y las estructuras de intercambio gaseoso, donde se reabsorben las branquias y se desarrollan pulmones; permiten un rápido crecimiento y adaptación en ambientes inestables y a su vez menor riesgo depredación. (Hernert, 1960; Laudet, 2011; McGarry, 2013). En la región bucal, desaparecen el disco oral con papilas y filas de dientes queratinosos y vainas mandibulares. Además, las mandíbulas se elongan y se desarrollan dientes. Asimismo, se puede notar un acortamiento en la región faríngea y las branquias y hendiduras branquiales desaparecen. También se modifica el hioides junto con segmentos del aparato branquial, lo cual sirve de soporte a la lengua (Vitt & Caldwell, 2014).

Uno de los cambios más significativos durante la metamorfosis es la transformación de un esqueleto cartilaginoso a uno predominantemente óseo en los individuos postmetamórficos (Hanken & Hall, 1988). Aunque las secuencias de osificación se encuentran disponibles para múltiples especies de ranas, hace falta más investigación en cuanto a los procesos de desarrollo cartilaginoso larvario. Las características morfológicas y temporales compartidas, así como aquellas que difieren, son de utilidad para analizar las relaciones filogenéticas y los distintos caminos evolutivos del desarrollo cartilaginoso (Lukas & Ziermann, 2022). Esta investigación es importante para dar luz sobre preguntas referentes a la evolución de la diversidad morfológica en anuros ya que la base de la misma se encuentra estrechamente relacionada con la ontogenia de los tejidos cartilaginosos (Lukas & Olsson, 2020).

Los vertebrados presentan una gran complejidad y diversidad en cuanto a su anatomía craneal(Hanken & Thorogood Peter, 1993). En la historia evolutiva de los vertebrados, los anfibios representan un nexo importante entre los peces de agua dulce y los reptiles. Por este motivo, el estudio de los anuros y sus distintos estadios larvarios representan un importante punto de vista en cuanto a la morfología comparativa (Lukas & Olsson, 2020).

A medida que se desarrollan los vertebrados, los cartílagos juegan un rol importante en el crecimiento y formación. Igualmente contribuyen a la ubicación, expansión y configuración de los huesos a medida que avanza el proceso de osificación endocondral (Kaucka & Adameyko, 2019). En los cordados, el aparato bucal se vio fortalecido durante la evolución debido a los cambios en la dieta, de alimentación por filtración a predación activa (Gans & Northcutt, 1983). Recientes estudios, identifican varios patrones de desarrollo en ranas basales los cuales se plantean como candidatos para el reconocimiento de la secuencia basal de desarrollo cartilaginoso en anuros (Lukas & Olsson, 2020; Lukas & Ziermann, 2022). En el presente estudio se contrasta dicha información con los resultados obtenidos.

Para la visualización de estructuras óseas, cartilaginosas y estudios embriológicos, se requiere del uso de dos tintes, Alizarin Red y Alcian Blue. Alizarin red es un tinte que forma complejos quelados en interacción con las sales de calcio inorgánico que conforman los huesos y permite el estudio de las estructuras óseas (Churukian, 2008). Por su parte, Alcian Blue se enlaza selectivamente a las estructuras cartilaginosas de los individuos utilizados (Atanasoff & Stefanov, 2017; Wassersug, 1976). Este último proceso se consigue en un medio ácido, en el cual los compuestos como el ácido hialurónico y proteoglicanos presentes en el tejido conectivo y cartílago, son ionizados, permitiendo así su visualización (Churukian, 2008).

Además, en el presente estudio se busca elucidar los estadios en los cuales diferentes estructuras cartilaginosas características de los dendrobátidos surgen, ya sea por presencia o ausencia de caracteres. Es necesario realizar una comparación entre los patrones espaciotemporales que siguen distintas especies de la misma familia en etapas tempranas del desarrollo embrionario.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el patrón de desarrollo del condrocráneo en *Hyloxalus nexipus* y *Epipedobates anthonyi*.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estandarizar la técnica de diafanización de tejidos embrionarios en embriones de anuros.

Identificar las similitudes y diferencias temporales en el desarrollo de estructuras cartilaginosas en el cráneo de *H. nexipus* y *E. anthonyi*.

Contrastar los resultados encontrados con los patrones de desarrollo observados en especies de anuros basales.

5. MÉTODOS

5.1. Obtención de los embriones

Los embriones de *Epipedobates anthonyi* e *Hyloxalus nexipus* se obtuvieron de la Iniciativa de Conservación “Balsa de los Sapos” de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Para mantener las posturas se las colocó en cajas Petri adaptadas con papel toalla y plástico para conservar las condiciones de humedad necesarias.

5.2. Fijación de embriones:

Se procedió a fijar los embriones de las especies mencionadas de Dendrobátidos en estadios 23, 24 y 25 de acuerdo con las tablas de desarrollo de (del Pino et al., 2004)y de (Hervas et al., 2015). Para ello, se colocó a los embriones en solución Steinberg 1x y con ayuda de pinzas de relojero se removió las membranas extraembrionarias de los individuos utilizados.

Los embriones que fueron removidos de sus membranas fueron transferidos al fijativo Dent’s en lavados graduales de 5 minutos. En primer lugar, fueron colocados en una solución de 25% Dent’s y 75% Steinberg 1x. Posteriormente a una solución de 50% Dent’s y 50% Steinberg 1x. Después a una solución de 75% Dent’s y 25% Steinberg y finalmente a una solución de 100% de fijativo Dent’s, en la cual se mantuvieron por un día a -20 °C. Pasadas las 24 horas, se procedió a almacenar los embriones en metanol al 100% a -20 °C hasta su respectivo uso.

-Solución de Steinberg (Cold Spring Harbor Protocols, 1970) **:**

- Cantidad a añadir a 1 L:
- NaCl: 3,4g
- KCl: 0,05g
- $Ca\ (NO_3)_2 \cdot 4H_2O$: 0,08g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,205g
- Tris: 0,56 g

- **Fijativo Dent's.**

    - 80% Me (OH)
    - 20% DMSO

5.3. Tinción de Hueso y Cartílago

Posterior a la fijación en Dent's de los embriones, se procedió a rehidratarlos en una solución de tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés) 1X. Para ello, fue necesario una transferencia gradual a dicha solución. Se realizaron lavados de 5 minutos al 25%, 50%, 75% y 100% de PBS 1X. Una vez realizado, se dejó reposar a 4 °C durante 24 horas. Al día siguiente se con ayuda de agujas de disección, se removieron meticulosamente las vísceras bajo el estereoscopio con el fin de facilitar la tinción requerida. A continuación, para la tinción de cartílago, se colocó al embrión en una solución de Alcian Blue (Alcian blue 0,02%, Ácido acético 2,5% y etanol 75%) en agitación hasta el día siguiente.

Pasadas las aproximadamente 15 horas, se transfirió al embrión a través de series de concentraciones decrecientes de etanol (100%, 95%, 70%, 40% y 15%) y luego dos cambios de agua destilada por al menos una hora en cada una. Una vez realizado, se procedió a la tinción de hueso. Para ello, será necesario poner al espécimen durante 12 horas en una solución de Alizarin red (0,02%) aforada con KOH 0,5%.

Posteriormente, para blanquear los tejidos del embrión, se lo transfirió a una solución al de 0,5% KOH y 3% de H2O2 durante 2 horas en agitación. Después de haber transcurrido dicho tiempo, se realizó lavados seriales de KOH 0,5%: Glicerol en proporciones: 3:1, 1:1, 1:3 durante 1 hora cada uno. Finalmente se colocó a los embriones en glicerol para poder observar los resultados.

5.4. Observación y análisis de datos

Para poder observar los individuos diafanizados, se los colocó en placas de vidrio cóncavas con glicerol. Los embriones fueron analizados ventral y dorsalmente. Para la captura de las imágenes respectivas fue utilizado un estereoscopio Olympus SZX16 y se fotografió con el *software* Cell Sense Estándar.

6. RESULTADOS

6.1. Desarrollo de *Epipedobates anthonyi*

6.1.1. Cartílago infrarostral

Es un cartílago que se encuentra emparejado, tiene forma de V y se conecta por su extremo posterior con ambos cartílagos de Meckel. Ambas partes del cartílago de Meckel se conectan sobre la línea media. En los embriones estudiados, se pueden observar que los cartílagos infrarostrales se encuentran formados desde el estadio 23 aunque a medida que avanza el desarrollo van adquiriendo su forma de V característica.

6.1.2. Cartílago suprarostral

El cartílago suprarostral compone la mandíbula superior de las larvas de renacuajos. Consiste de dos elementos, el pars corporis y el pars alaris. Las regiones proximales de dicho cartílago se encuentran fusionadas a los cuernos trabeculares. En estadio 23, ninguno de los dos componentes se puede observar. El primero en desarrollarse es el pars alaris, que aparece en estadio 24 mientras que el pars corporis se puede observar un estadio más tarde.

6.1.3. Cartílago de Meckel

El cartílago de Meckel aparece como un componente mandibular en las larvas de los renacuajos. Se ubica entre el cartílago infrarostral y el palatocuadrado y durante el desarrollo, se puede observar como sus extremos posterior y anterior se ensanchan de manera gradual a la par de reorientarse horizontalmente. Además, a medida que el embrión se desarrolla, dicho cartílago se elonga, perdiendo así algo de curvatura.

6.1.4. Palatocuadrado

El palatocuadrado se encuentra rodeando lateralmente las estructuras neuro craneales a las cuales se conecta a través de las comisuras cuadratocraneales y los procesos ascendentes en sus extremos anterior y posterior respectivamente. Durante el estadio

23, la comisura cuadratocraneal ya se encuentra condrificada mientras que los procesos ascendentes no terminan de unir al palatocuadrado con el neurocráneo. En los dos estadios posteriores ya se puede evidenciar una completa condrificación de los procesos ascendentes. Es decir, las estructuras que unen el palatocuadrado al neurocráneo siguen un patrón de desarrollo de anterior a posterior.

6.1.5. Ceratohyal

El ceratohyal es un cartílago emparejado que consta de un corpus y de procesos lateral, anterior y posterior, así como de un pars reuniens que junta ambos ceratohyales. Esta estructura se encuentra orientada de manera horizontal y sus extremos laterales se pliegan posteriormente. Durante el estadio 23, el corpus del ceratohyal ya se encuentra formado pero los procesos anterior y lateral se forman aparecen condrificados en el estadio 24, es decir todos los componentes del ceratohyal ya se encuentran formados para este estadio.

6.1.6. Cesta branquial

La cesta branquial se compone de la placa hipobranquial y cuatro ceratobranquiales de cada lado. La región anterior de la placa hipobranquial se une lateralmente con ambos ceratobranquiales I. Los ceratobranquiales por su parte se encuentran unidos en sus extremos posteriores por comisuras terminales. Se puede observar que el desarrollo de los ceratobranquiales sigue un patrón anterior-posterior. En estadio 23 se pueden observar los ceratobranquiales I y II. En estadio 24 el ceratobranquial III ya se encuentra formado mientras que el ceratobranquial IV no se ha condrificado todavía. Lo mismo sucede con las comisuras terminales, en estadio 24 se puede observar que se han desarrollado las comisuras terminales I y II mientras que la comisura terminal III se termina de desarrollar en estadio 25.

6.2. Desarrollo de *Hyloxalus nexipus*

6.2.1. Cartílago infrarostral

En los individuos utilizados, el componente infrarostral no se puede observar en dos de los tres estadios estudiados por lo que su secuencia de desarrollo no se puede analizar.

6.2.2. Cartílago suprarostral

Al igual que en *E. anthonyi,* el primer componente en ser observable es el par alaris, el cual puede ser observado en estadio 24. En estadio 25, ya se encuentra desarrollado de igual manera los pars alaris. Es decir, los componentes alares laterales se desarrollan primero que los componentes mediales corpóreos.

6.2.3. Cartílago de Meckel

No se puede analizar el desarrollo de los cartílagos de Meckel debido a que en las muestras disponibles dicha estructura se desprendió, posiblemente durante el proceso de tinción de cartílago.

6.2.4. Palatocuadrado

El proceso de desarrollo del palatocuadrado es muy similar al observado en *E. anthonyi.* Las estructuras que lo unen al neurocráneo siguen un patrón de desarrollo anterior-posterior al igual que en los embriones de *E. anthonyi.* En estadio 23 aparecen desarrolladas las comisuras cuadratocraneales mientras que los procesos ascendentes aparecen formados en estadio 24.

6.2.5. Ceratohyal

Durante el estadio 23, el corpus del ceratohyal ya se encuentra formado junto con los procesos posteriores. Los procesos anterior y lateral por su parte aparecen formados en el estadio 24.

6.2.6. Cesta branquial

En esta especie, se puede observar que el desarrollo de los ceratobranquiales sigue de igual manera un patrón anterior-posterior. En estadio 23 no se observa ceratobranquiales. Por su parte, en estadio 24, los ceratobranquiales I y II ya se encuentran formados. Finalmente, en estadio 25 los ceratobranquiales I-IV ya se encuentran completamente desarrollados. No se puede saber si las comisuras terminales siguen el mismo patrón ya que se observa que en estadio 25 ya se encuentran completamente desarrolladas, a diferencia de lo visto en estadio 24, cuando no es posible evidenciar las comisuras terminales.

7. DISCUSIÓN

- Estandarización de tinción de hueso y cartílago en larvas de anuros

Para la tinción de hueso y cartílago es necesario que los embriones se encuentren fijados en metanol ya que cuando se empleó fijativos basados en aldehídos (formaldehído o paraformaldehído) el tejido integumentario del embrión se tiñó de azul impidiendo así el análisis de las estructuras cartilaginosas.

Es necesario también considerar que las concentraciones de ácido acético, metanol y Alcian blue sean apropiadas. Una concentración más alta de ácido acético y etanol, por ejemplo, no permiten que el tinte azul se adhiera a los tejidos cartilaginosos por lo que la tinción no sería efectiva.

Al momento de depositar al embrión en la solución de Alizarin red, posterior a los lavados de etanol, es necesario tener en cuenta que concentraciones superiores a 0,5% de KOH disuelven los tejidos de la muestra o los debilitan lo suficiente como para imposibilitar el trabajo con dichos tejidos sin dañarlos.

Finalmente, para blanquear la pigmentación de la piel de los embriones es necesario colocarlos en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno a la misma concentración de KOH presente en la solución de Alizarin red. El tiempo que permanezcan los embriones en dicha solución dependerá del tamaño y de la pigmentación presente en el organismo. Se deberá revisar constantemente el estado del embrión con el fin de evitar que se desintegre a causa del H_2O_2 y en caso de formación excesiva de burbujas se las deberá remover mecánicamente.

-Secuencia de desarrollo de la formación del cartílago

Debido a que el estadio más temprano en el cual se trabajó ya se encuentran desarrollados varios componentes del condrocráneo, no se puede saber si al igual que en *B. orientalis* y *X. laevis* es el primer cartílago que en condrificarse(Lukas & Olsson, 2020).

Para los estadios estudiados ya se encuentran desarrollados los elementos del neurocráneo: cuernos trabeculares, trabécula cranii, paracordales y cápsulas óticas. Es por ello que no se puede analizar si su desarrollo es de anterior a posterior en las estructuras más anteriores y de posterior a anterior en las estructuras más posteriores tal como se observa en *Discoglossus scovazzi, B. orientalis* y *Xenopus laevis* (Lukas & Olsson, 2020; Lukas & Ziermann, 2022). Por otra parte, las estructuras que unen al palatocuadrado con el neurocráneo sí parecen seguir el patrón anterior-posterior ancestral observado en ranas basales, primero la comisura cuadratocraneal y después el proceso ascendente del palatocuadrado (Lukas & Olsson, 2020). Finalmente, se puede observar un patrón de desarrollo de anterior a posterior en las cestas branquiales de ambas especies, igual a lo observado en especies basales (Lukas & Olsson, 2020).

En un género de ranas más basales, *Ascaphus,* los componentes laterales (pars alaris) del cartílago suprarostral se condrifican después de los componentes mediales (pars

corporis) (Pugener et al., 2003). En *B. orientalis* y en *X. laevis*, sucede lo contrario, los pars alaris se desarrollan antes que los pars corporis (Lukas & Ziermann, 2022). Para ambas especies de dendrobátidos estudiadas, el patrón de desarrollo del cartílago suprarostral es similar al de *B. orientalis* y *X. laevis*, lo cual plantea posibles escenarios. 1) El patrón observado en *A. truei* es un rasgo derivado de dicha especie mientras que el patrón observado en las otras tres espescies corresponde a una apomorfía para los anuros. 2) La secuencia de desarrollo observada en *A. truei* es un carácter ancestral mientras que el observado en *X. laevis*, *B. orientalis*, *H. nexipus* y *E. anthonyi* corresponde a un carácter derivado.

8. CONCLUSIONES

Mediante el estudio de caracteres morfológicos se puede conocer las relaciones filogenéticas y los caracteres derivados y ancestrales producto de la evolución. Con el estudio del condrocráneo en dendrobátidos se pueden identificar las secuencias del desarrollo e hipotetizar a partir de ello las características propias tanto de anuros como otras familias dentro del orden. El presente estudio establece una base para futuros estudios sobre el desarrollo cartilaginoso y óseo de la familia Dendrobatidae.

9. REFERENCIAS

Atanasoff, A., & Stefanov, I. S. (2017). Elaboration of transparent biological specimens for visualisation of developing cartilage and bone structures. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, *20*(1), 27–32.

Churukian, C. J. (2008). Pigments and Minerals. In *Theory and Practice of Histological Techniques* (6th ed., pp. 233–259). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-443-10279-0.50021-X

Cold Spring Harbor Protocols. (1970). *Steinberg's solution (100%)*. Cold Spring Harbor Protocols. http://cshprotocols.cshlp.org/content/2009/8/pdb.rec11904.full?text_only=true

Coloma, L., Frenkel, C., & Ron, S. (2022). *Epipedobates anthonyi*. Anfibios Del Ecuador. Version 2022.0. https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Epipedobates%20anthonyi

del Pino, E. M., Ávila, M. E., Pérez, O. D., Benítez, M. S., Alarcón, I., Noboa, V., & 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

Gans, C., & Northcutt, R. G. (1983). Neural Crest and the Origin of Vertebrates: A New Head. *Science*, *220*(4594), 268–273. https://doi.org/10.1126/science.220.4594.268

Haas, A. (1995). Cranial Features of Dendrobatid Larvae (Amphibia: Anura: Dendrobatidae). *Journal of Morphology*, *224*, 241–264. https://doi.org/10.1002/jmor.1052240302

Hanken, J., & Hall, B. K. (1988). Anatomy and Embryology Skull development during anuran metamorphosis II. Role of thyroid hormone in osteogenesis. *Anatomy and Embryology*, *178*, 219–227. https://doi.org/10.1002/jmor.1051950303

Hanken, J., & Thorogood Peter. (1993). Evolution and Development of the Vertebrate Skull: The Role of Pattern Formation. *Elsevier Science Publishers Ltd.*, *8*(1). https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90124-8

Hernert, A., & Frieden, E. (1960). Biochemistry of Anuran Metamorphosis: VII. CHANGES IN SERUM PROTEINS DURING SPONTANEOUS AND INDUCED METAMORPHOSIS. *Journal of Biological Chemistry*, *235*(10), 2845–2851. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64551-X

Hervas, F., Torres, K. P., Montenegro-Larrea, P., & del Pino, E. M. (2015). Development and gastrulation in Hyloxalus vertebralis and Dendrobates auratus (Anura: Dendrobatidae). *Amphibian & Reptile Conservation*, *8*(1), 121–135.

Kaucka, M., & Adameyko, I. (2019). Evolution and development of the cartilaginous skull: From a lancelet towards a human face. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *91*, 2–12. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.12.007

Larrea, P. M., & del Pino, E. M. (2011). La gastrulación de Epipedobates anthonyi (Anura: Dendrobatidae). *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, *32*. https://doi.org/10.26807/remcb.v32i1-2.209

Laudet, V. (2011). The origins and evolution of vertebrate metamorphosis. *Current Biology*, *21*, 726–737. https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.07.030

Lukas, P., & Olsson, L. (2020). Sequence of chondrocranial development in the oriental fire bellied toad Bombina orientalis. *Journal of Morphology*, *281*(6), 688–701. https://doi.org/10.1002/jmor.21138

Lukas, P., & Ziermann, J. M. (2022). Sequence of chondrocranial development in basal anurans—Let's make a cranium. *Frontiers in Zoology*, *19*(17). https://doi.org/10.1186/s12983-022-00462-z

MacKenzie, E. M., Atkins, J. B., Korneisel, D. E., Cantelon, A. S., McKinnell, I. W., & Maddin, H. C. (2022). Normal development in Xenopus laevis: A complementary staging table for the skull based on cartilage and bone. *Developmental Dynamics*, *251*(8), 1340–1356. https://doi.org/10.1002/dvdy.465

McDiarmid, R., & Altig, R. (1999). Tadpoles - The Biology of Anuran Larvae. In *University Of Chicago Press*. University of Chicago Press.

Myers, P., Espinosa, R., Parr, C., Jones T., Hammond, G., & Dewey, T. (2023). *The Animal Diversity Web (online)*. https://animaldiversity.org

Nieuwkoop, P., & Faber, J. (1994). Normal Table of Xenopus Laevis (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis. In *Garland Publishing* (Vol. 1). Garland Science. https://doi.org/10.1201/9781003064565

Ortiz, D., Coloma, L., & Frenkel, C. (2022). *Hyloxalus nexipus*. Anfibios Del Ecuador. Version 2022.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica Del Ecuador. . https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Hyloxalus%20nexipus

Santos, J. C., Tarvin, R. D., & O'Connell, L. A. (2016). A Review of Chemical Defense in Poison Frogs (Dendrobatidae): Ecology, Pharmacokinetics, and Autoresistance. In *Chemical Signals in Vertebrates 13* (pp. 305–337). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22026-0_21

Schulte, L. M., & Mayer, M. (2017). Poison frog tadpoles seek parental transportation to escape their cannibalistic siblings. *Journal of Zoology*, *303*(2), 83–89. https://doi.org/10.1111/jzo.12472

Vitt, L. J., & Caldwell, J. P. (2014). Anatomy of Amphibians and Reptiles. In *Herpetology* (4th ed., pp. 35–82). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386919-7.00002-2

Wassersug, R. J. (1976). A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin-fixed vertebrates. *Stain Technology*, *51*(2), 131–134. https://doi.org/10.3109/10520297609116684

Wells, K. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians* (Vol. 1). The University of Chicago Press.

10. FIGURAS

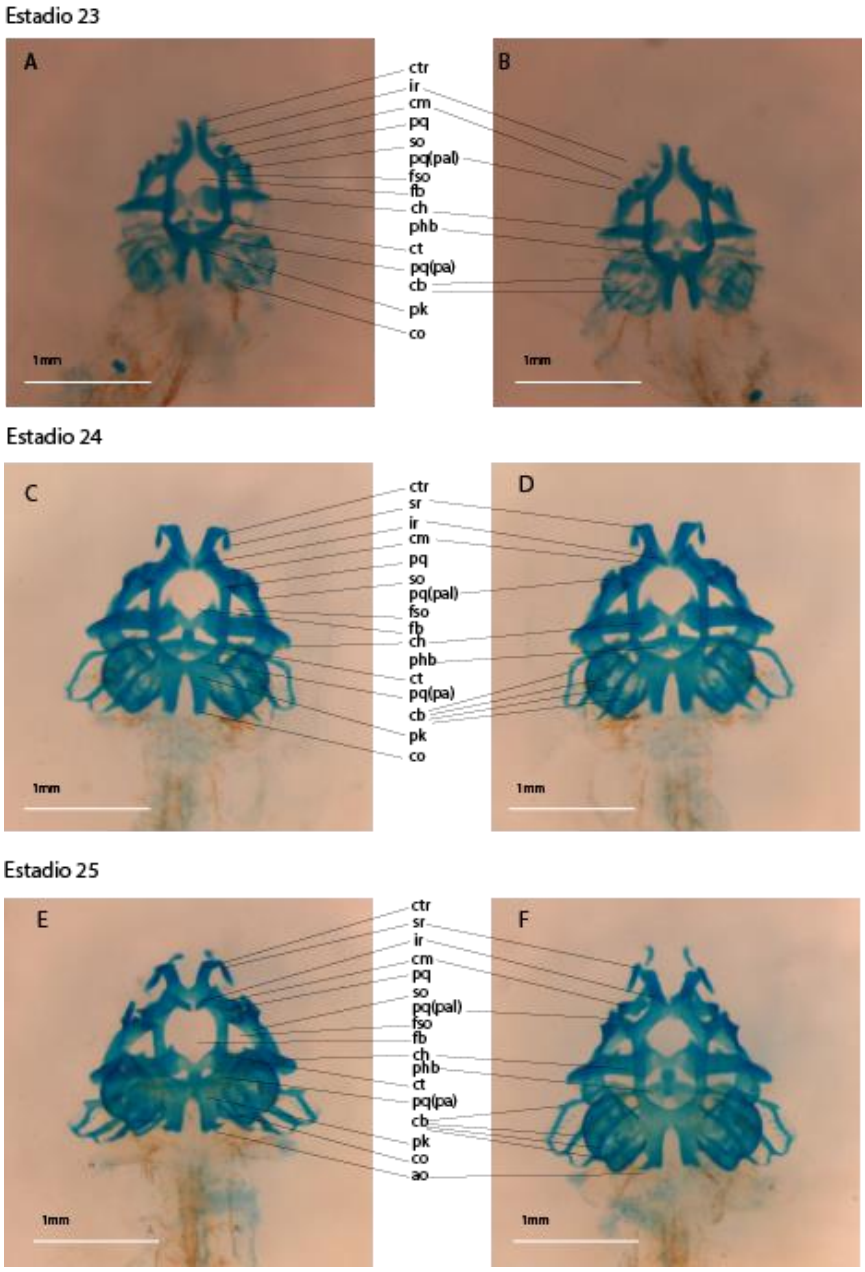


Figura 1. Desarrollo del condrocráneo desde estadio 23 al 25 en *E. anthonyi*. Las fotografías de la izquierda fueron tomadas desde una vista dorsal y las de la derecha desde una vista ventral. El cartílago fue teñido de azul con Alcian Blue. Estadio 23 (A-B), estadio 24 (C-D), estadio 25 (E-F). Las barras de escala representan 1 mm. co, capsula ótica; ao, arco occipital; cm, cartílago de Meckel; sr, placa suprarostral; fb, fenestra basicranial; pk, paracordal; cb, ceratobranquiales; pq(pa): proceso ascendente del palatocuadrado; phb, placa hipobranquial; ct, cartílago trabecular; so, cartílago subocular; ch, ceratohyal; pq, palatocuadrado; pq(pal), pars alaris del palatocuadrado; fso, fenestra subocular; ctr, cuernos trabeculares.

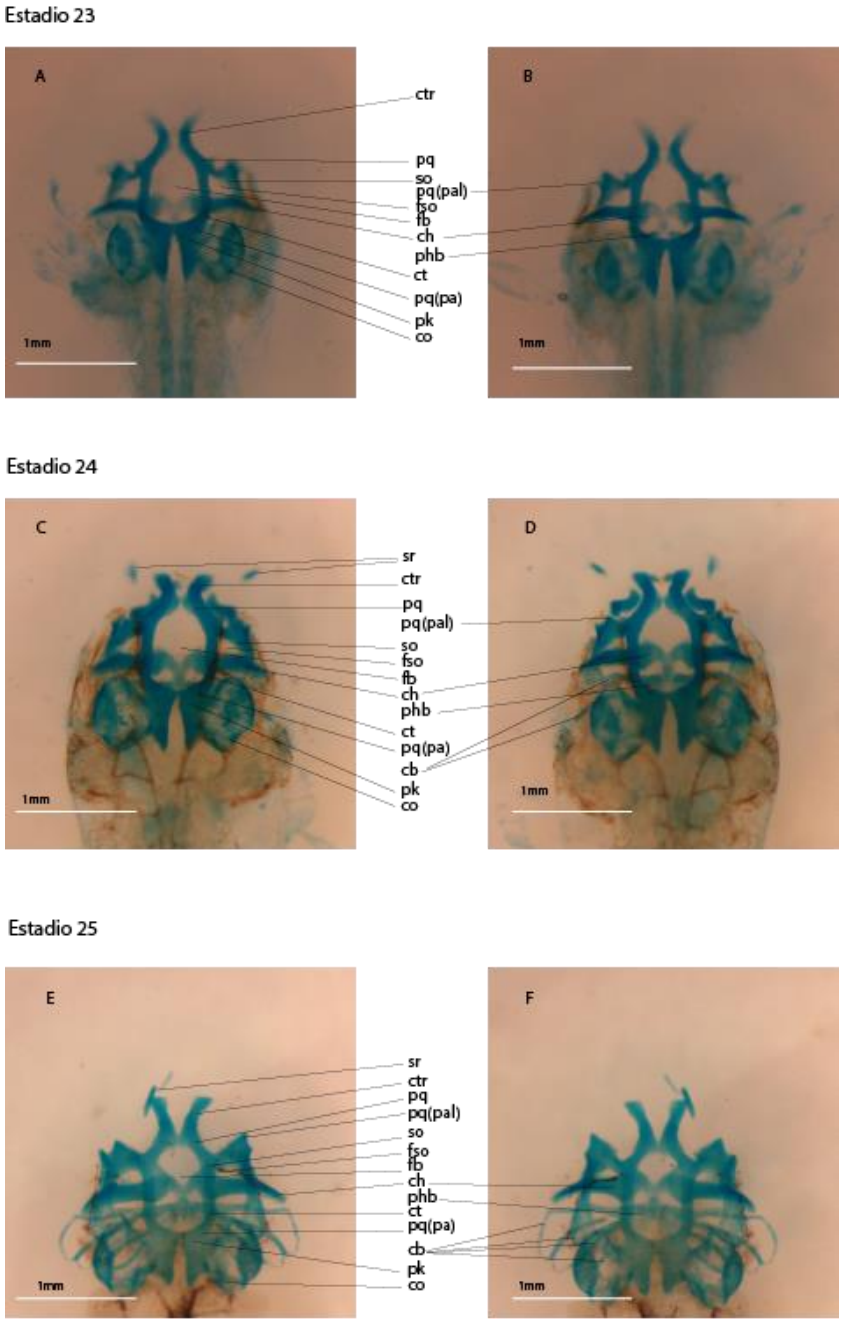


Figura 2. Desarrollo del condrocráneo desde estadio 23 al 25 en *H. nexipus*. Las fotografías de la izquierda fueron tomadas desde una vista dorsal y las de la derecha desde una vista ventral. El cartílago fue teñido de azul con Alcian Blue. Estadio 23 (A-B), estadio 24 (C-D), estadio 25 (E-F). Las barras de escala representan 1 mm. co, capsula ótica; ao, arco occipital; cm, cartílago de Meckel; sr, placa suprarostral; fb, fenestra basicranial; pk, paracordal; cb, ceratobranquiales; pq(pa): proceso ascendente del palatocuadrado; phb, placa hipobranquial; ct, cartílago trabecular; so, cartílago subocular; ch, ceratohyal; pq, palatocuadrado; pq(pal), pars alaris del palatocuadrado; fso, fenestra subocular; ctr, cuernos trabeculares.

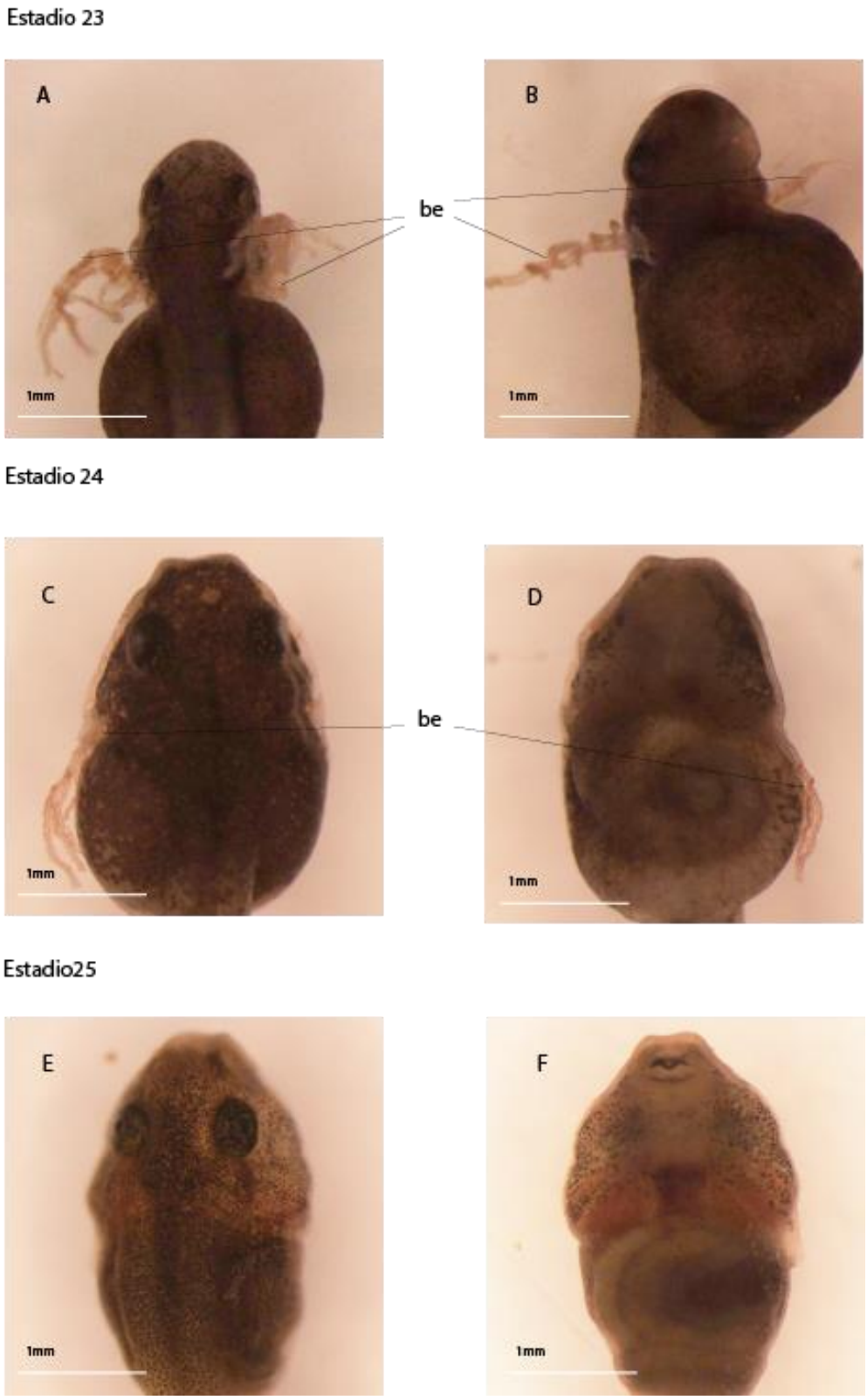


Figura 3. Embriones *E. anthonyi* utilizados para la tinción de cartílago con Alcian blue. Estadio 23 (A-B), estadio 24 (C-D), estadio 25 (E-F). Las barras de escala representan 1 mm. be, branquias embrionarias.

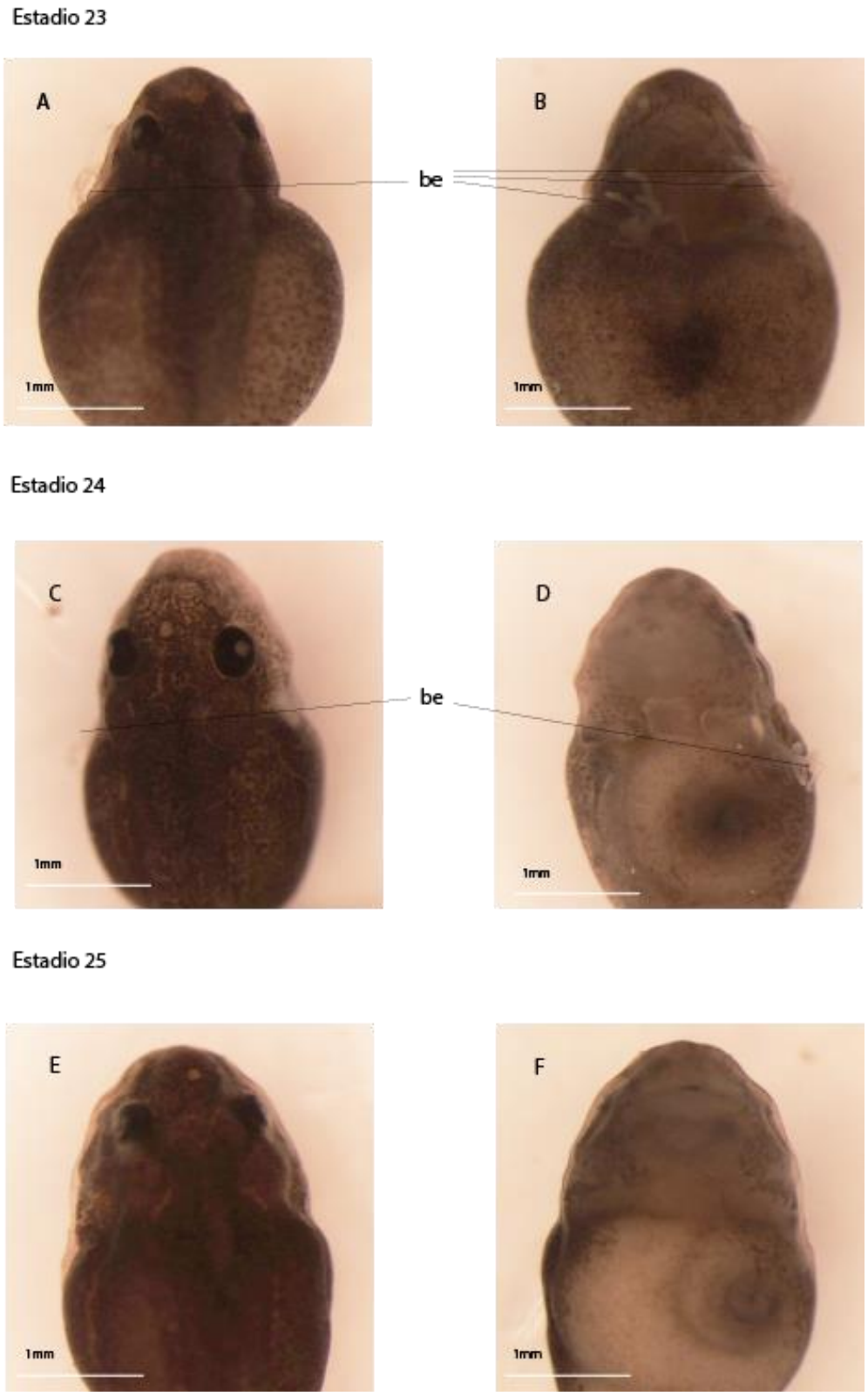


Figura 4. Embriones *H. nexipus* utilizados para la tinción de cartílago con Alcian blue. Estadio 23 (A-B), estadio 24 (C-D), estadio 25 (E-F). Las barras de escala representan 1 mm. be, branquias embrionarias.

11. TABLAS

Cartílago	**Estadios – *Epipedobates anthonyi***		
	23	24	25
Cartílago infrarostralis			
Cartílago suprarostralis			
Pars alaris			
Pars corporis			
Cartílago de Meckel			
Palatocuadrado			
Proceso articular			
Comisura cuadratocranial			
Proceso ascendente			
Ceratohyal			
Proceso anterior			
Proceso lateral			
Condilo articular			
Proceso posterior			
Pars reuniens			
Placa hipobranquial			
Ceratobranquial I			
Comisura proximal I			
Comisura terminal I			
Ceratobranquial II			
Comisura proximal II			
Comisura terminal II			
Ceratobranquial III			
Comisura proximal III			
Comisura terminal III			
Ceratobranquial IV			
Cuernos trabeculares			
Placas etmoidales			
Cartílago paracordal			
Cápsula ótica			
Tectum sinoticum			

	Presente
	Ausente

Tabla 1. Secuencia del desarrollo cartilaginoso en *Epipedobates anthonyi*

Cartílago	**Estadios – *Hyloxalus nexipus***		
	23	24	25
Cartílago infrarostral			
Cartílago suprarostral			
Pars alaris			
Pars corporis			
Palatocuadrado			
Comisura cuadratocranial			
Proceso ascendente			
Ceratohyal			
Proceso anterior			
Proceso lateral			
Condilo articular			
Proceso posterior			
Pars reuniens			
Placa hipobranquial			
Ceratobranquial I			
Comisura proximal I			
Comisura terminal I			
Ceratobranquial II			
Comisura proximal II			
Comisura terminal II			
Ceratobranquial III			
Comisura proximal III			
Comisura terminal III			
Ceratobranquial IV			
Cuernos trabeculares			
Placas etmoidales			
Cartílago paracordal			
Cápsula ótica			
Tectum sinoticum			

	Presente
	Ausente

Tabla 2. Secuencia del desarrollo cartilaginoso en *Hyloxalus nexipus*