

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Descripción parcial de la oogénesis de *Gastrotheca orophylax* (Anura, Hemiphractidae)

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

MICHELLE X. HARO RAMOS

Quito, 2016

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Michelle Haro Ramos ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Óscar D. Pérez

Director de la Disertación

Quito, de 2016

“No creas que la vida es muy corta, lo que es muy corta es la juventud y si tu no la aprovechas estudiando o superándote entonces la vejez será tu cruz”

-Juan Gabriel

AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a Dios, ya que nada hubiera sido posible sin su intervención.

A la Pontificia Universidad Católica, por el financiamiento para realizar este proyecto.

A Óscar Pérez, Director de mi proyecto de disertación por acogerme en el Laboratorio de Biología del Desarrollo. Por su confianza depositada en mí para la realización de este proyecto, por su constante apoyo, correcciones, paciencia e incentivo para aprender del fascinante mundo de la ciencia del desarrollo.

A Myrian Rivera y colaboradores por abrirme las puertas del laboratorio de Citogenética y permitirme usar sus instalaciones y guiarme con sus conocimientos técnicos para la elaboración de este proyecto.

A Verónica Velastegui quien me presentó a Luis Yaselga del laboratorio de Patología en el Hospital Oncológico Solca, quien me facilitó con la técnica de los cortes histológicos, por su amable e infalible ayuda.

A Fran Angiolani quien aparte de ser parte del laboratorio de Biología del Desarrollo se convirtió en mi amiga y estuvo siempre conmigo, por guiarme en el proceso. Muchas Gracias por esa sincera amistad y alentarme siempre a seguir adelante con el estudio.

A Elysio, Kathya y quienes colectaron el material para poder realizar este estudio.

A mi madre Ximena Ramos, por apoyar emocional y económicamente mi carrera. Por su infinito amor y comprensión. Gracias porque además de ser mi madre es mi amiga, por enseñarme que a través del camino de Dios nada es imposible. Por confiar siempre en mí. Por siempre escucharme y entenderme. Te Amo madrecita.

A mi padre Gonzalo Haro, por haberme inculcado el amor por la ciencia, por su constante apoyo tanto económico como emocional. Gracias por enseñarme, guiarme y darme ánimo constantemente y por su confianza en mí. Por haber comprendido con cariño y haberme acompañado esas salidas inoportunas de campo. Te Amo padrecito.

A mi amada familia; hermanos y hermanas, Pedro, Pablo, Gonzalo, Lusa, Karla por su constante apoyo y consejos los que me ayudaron a llegar hasta este punto. A mi tía Lucía, por su cariño incondicional, su apoyo y comprensión. Por acogerme y apoyarme emocional y económicamente. Los amo

A mi mejor amiga Paola Chávez, quien se convirtió en mi familia. Gracias por todos esos momentos inolvidables de la carrera. Ha sido el mejor apoyo incondicional a lo largo de este proceso, por no dejarme desmayar y mostrarme el amor verdadero.

A mi mejor amigo Josué Arteaga, quien se convirtió en mi familia. Por su apoyo incondicional y paciencia a lo largo de toda la carrera. Por sus consejos y por haber siempre estado dispuesto a prestarme su ayuda y compartir su sabiduría conmigo.

A Carolina, Paola P., Daniela, Katherine, mis amigos y compañeros por todas las experiencias vividas las que jamás olvidaré. Gracias por su cariño, amor y felicidad compartida conmigo.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT	2
3.	INTRODUCCIÓN	3
3.1.	OOGÉNESIS	3
3.2.	ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS	9
3.3.	<i>Gastrotheca orophylax</i>	10
4.	OBJETIVOS.....	11
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	12
5.1.	COLECCIÓN Y MANTENIMIENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	12
5.2.	EXTRACCIÓN OVARIOS	12
5.3.	MANTENCIÓN Y FIJACIÓN DE TEJIDOS GERMINALES FEMENINOS.....	12
5.4.	FIJACIÓN, CORTES HISTOLÓGICOS, MICROFOTOGRAFÍA DIGITAL, ANÁLISIS DE MICROGRAFÍAS	13
6.	RESULTADOS	15
6.1.	ESTADIO II (TEMPRANO):	15
6.2.	ESTADIO II (TARDÍO):	15
6.3.	ESTADIO III	16
6.4.	ESTADIO IV	17
6.5.	ESTADIO V	17
6.6.	ESTADIO VI	18
7.	DISCUSIÓN.....	19
8.	CONCLUSIONES	26
9.	REFERENCIAS	28

LISTA DE FIGURAS	36
Figura 1. <i>Gastrotheca orophylax</i>	38
Figura 2. Oocitos Estadio II (temprano)	40
Figura 3. Oocitos Estadio II (tardío)	42
Figura 4. Oocitos Estadio III.....	44
Figura 5. Oocitos Estadio IV	46
Figura 6. Oocitos Estadio V.....	48
Figura 7. Oocitos Estadio VI	50

LISTA DE TABLAS	51
Tabla 1. Medidas obtenidas del diámetro en micras (μm) de oocitos para cada estadio	52
Tabla 2. Medidas obtenidas del diámetro de la vesícula germinal en micras (μm) de oocitos para cada estadio	53

LISTA DE ANEXOS	54
Anexo 1.- Tabla de ovogénesis comparando los 6 estadios de <i>Xenopus laevis</i>	55
Anexo 2.- Presencia de cuerpos nucleares aislados de la vesícula germinal de <i>Xenopus laevis</i>	56
Anexo 3.- Microscopía de contraste de fases mediante las técnicas de Immunostaining e hibridización <i>in-situ</i> fluorescente.....	57
Anexo 4.- Mapa de localización de la especie <i>Gastrotheca orophylax</i>	58

1. RESUMEN

El proceso en el que se desarrollan los oocitos se denomina oogénesis. Este proceso ha sido descrito detalladamente en *Xenopus laevis* con seis estadios. Esta rana posee un modo de desarrollo bifásico. La oogénesis para las ranas marsupiales ha sido descrita en *Gastrotheca riobambae* que, de igual manera, presenta un modo de desarrollo bifásico. Esta especie es utilizada como modelo para el grupo de los hemifrácidos. Dentro del grupo de los hemifrácidos se encuentra *Gastrotheca orophylax* que difiere de *G. riobambae* por tener desarrollo directo. No existen registros de estudios realizados en la oogénesis para *G. orophylax* ni tampoco para ningún hemifrácido con desarrollo directo. Se realizaron cortes histológicos de los oocitos y luego tinción con eosina-hematoxilina. Para la clasificación de los estadios se tomó en cuenta las características celulares, nucleares y presencia de estructuras del citoplasma de la célula. También se consideraron las diferencias de las medidas de tamaño, capas de recubrimiento del oocito y núcleo. Se encontraron seis estadios de la oogénesis para *G. orophylax* mostrando similitudes celulares con *G. riobambae* y *X. laevis*. En cuanto al tamaño, el último estadio en *G. orophylax* es considerablemente mayor a las otras dos especies. El presente estudio en *G. orophylax* proporciona la primera descripción de la oogénesis para un miembro del género *Gastrotheca* con desarrollo directo, aportando así mayor conocimiento acerca de su estrategia reproductiva.

Palabras clave: desarrollo directo, *Gastrotheca orophylax*, hemifrácido, oocito, oogénesis.

2. ABSTRACT

Oogenesis is the process by which oocytes develop. In *Xenopus laevis*, oogenesis has been described in detail. *X. laevis* has a biphasic mode of development and its oocytes present six stages of development. This is similar to the oogenesis of marsupial frogs such as, *Gastrotheca riobambae*, making it the model for the group of anuran hemiphractids. *Gastrotheca orophylax* belongs to the hemiphractid's group. However, this species has a direct development mode. There are no studies describing the oogenesis of *G. orophylax*, nor for any other hemiphractid with direct development. For this study, histological sectioning was made from oocytes of a female frog, applying after eosin-hematoxilin dye. Cellular characteristics were taken into account for oocyte stage classification including, characteristics such as presence of structures in the cell cytoplasm, nuclear structures, diameter measurements and membrane coating. Six oogenesis stages were determined for *G. orophylax*, presenting cellular similarities with *G. riobambae* and *X. laevis*. The oocyte size of the last stage in *G. orophylax* is remarkably bigger than the other two species. The present study provides the first description of the oogenesis of a member of a *Gastrotheca* species with direct development and contributes to a better understanding of *G. orophylax*'s reproductive strategy.

Key words: Direct development, *Gastrotheca orophylax*, hemiphractid, oocyte, oogenesis.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. OOGÉNESIS

La producción de gametos haploides (huevo y espermatozoide) se da por medio de la meiosis siendo ésta un tipo de división celular. Donde las células producto reducen a la mitad la cantidad de información genética. La meiosis comprende dos ciclos de división para conseguir la replicación de ADN, mediante la segregación cromosómica. En la primera división meiótica los cromosomas homólogos se emparejan intercambiando información mediante recombinación, mientras que, en la segunda división las cromátidas se separan resultando en células haploides que se convierten en gametos (Gilbert, 2010, 2014; Hillers *et al.*, 2015).

En el primer ciclo o división meiótica ocurre la preparación y condensación cromosómica. El periodo de Profase I es el comienzo del primer ciclo meiótico y es donde se da el emparejamiento de cromátidas (Alberts, 2002; Hillers *et al.*, 2015). Este a su vez, se divide en: leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. El primer arresto meiótico ocurre en el estadio de diploteno de la profase I. En los oocitos de anfibios, éste es un periodo prolongado de crecimiento celular, donde los cromosomas se encuentran condensados, activos en la transcripción y adquieren la configuración plumosa (Alberts, 2002; Elinson y del Pino, 2012; Zickler y Kleckner, 2015). Este crecimiento de los oocitos puede persistir durante meses (Farrell, 2015).

El proceso en el que se desarrollan los oocitos se denomina Oogénesis (Gilbert, 2010, 2014; Wolpert y Tickle, 2011). En este proceso se empiezan a sintetizar y ubicar ARNs mensajeros maternos (ARNm) y proteínas encargadas del desarrollo temprano. De igual manera, en el citoplasma del oocito, se forman organelas responsables de la acumulación y producción de energía como ribosomas, yema y mitocondrias (Gilbert, 2010, 2014).

En las ranas marsupiales el proceso de incubación embrionaria no solo depende de cambios reproductivos en la madre y en el desarrollo embrionario, sino también de modificaciones excepcionales en el proceso de la oogénesis (del Pino, 1989; Saenz-Ponce,

Mitgutsch y del Pino, 2012; Elinson y del Pino, 2012; Farrell, 2015). El tipo de oogénesis puede ser sincrona o asincrona. La oogenesis sincrona sucede cuando un grupo de oocitos crece en el ovario, mientras que el resto de oocitos se mantiene de tamaño pequeño durante una temporada reproductiva determinada. *Gastrotheca riobambae* cuenta con oogénesis sincrona. Durante el periodo de incubación *G. riobambae* cuenta con oocitos de los últimos estadios (estadio VI), mientras que los oocitos de estadios IV y V se encuentran ausentes. Al mismo tiempo, los oocitos de estadios tempranos (I al III) se mantienen pequeños y retoman su crecimiento después del nacimiento de renacuajos (del Pino, 1989; del Pino *et al.*, 1986). En *X. laevis* la oogenesis es asincrona, donde todos los estadios de los oocitos se sitúan simultáneamente en el ovario. Este tipo de oogenesis asincrona es más favorable ya que la hembra se encuentra siempre lista para producir oocitos en el ovario (Davidson y Hough, 1969; del Pino, 1989; Smith, Xu y Varnold, 1991).

En la mayoría de los vertebrados, así como también en la mayoría de ranas arbóreas cada oocito contiene una sola vesícula germinal (núcleo del oocito). En otras especies de anuros (del Pino, 1989; Farrell, 2015) los oocitos pre-vitelogénicos contienen alrededor de 4 a 3000 vesículas germinales las cuales desaparecen progresivamente hasta que solo una se mantiene en el oocito; este fenómeno es llamado oogénesis multinucleada propuesta en *Flectonotus pygmaeus* (del Pino y Humphries, 1978). Por otro lado, está la oogénesis mononucleada, donde el oocito tiene una sola vesícula germinal a lo largo del proceso de oogénesis. Los oocitos de la mayoría de especies de ranas arbóreas con cuidado parental del huevo pertenecen al tipo de oogénesis mononucleada como *Gastrotheca riobambae*. De igual manera, los oocitos de *X. laevis* son mononucleados (del Pino, 1989; Elinson y del Pino, 2012; Farrell, 2015). Se consideran 6 estadios de la oogénesis basándose en la anatomía del oocito en desarrollo (Dumont, 1972), tanto en *X. laevis* como en *G. riobambae* (del Pino *et al.*, 1986; Elinson y del Pino, 2012; Schmid *et al.*, 2012) (Anexo 1).

El proceso de vitelogénesis se da cuando existe producción de una gran cantidad de yema proteica necesaria para la maduración del oocito, ésta se forma en cierta fase del desarrollo del oocito. Se denominan oocitos pre-vitelogénicos a aquellos que no han iniciado el proceso de acumulación de yema; mientras que los post-vitelogénicos son aquellos que han culminado el

proceso de acumulación de yema (Dumont, 1972; Farrell, 2015). Las proteínas derivadas de la vitelogenina son el componente principal de las plaquetas de yema (Sretarugsa *et al.*, 2001; Buschiazzo y Alonso, 2005; Gilbert, 2010).

Una vez que el oocito continúa creciendo, en los primeros estadios las plaquetas de yema empiezan a aparecer en la periferia del oocito. Las plaquetas de yema se acumulan centralmente en el oocito y los bordes hacia el oolema quedan desprovistos de yema esta región se denomina zona cortical basofílica. Esta zona está conformada por depósitos de pigmento debido a la expansión de yema. En el caso de *Rana* sp. , *Bufo* sp. o en *Xenopus* sp., presentan la zona cortical basofílica ya que en los oocitos de las especies con desarrollo acuático, el polo animal del oocito es pigmentado (Kemp, 1953; Sretarugsa *et al.*, 2001; Elinson y del Pino, 2012). A medida que continúa el proceso de vitelogénesis, tanto en *Xenopus laevis* como en *Rana pipiens* las plaquetas se expanden a través de todo el oocito. También éstas se llegan a concentrar y acumular en forma de citoplasma perinuclear hacia el borde vegetal de la vesícula germinal (Kemp, 1953; Rasar y Hammes, 2006). Dumont (1972) lo describe como citoplasma basofílico. Este proceso es llamado síntesis periférica de yema (Kemp, 1953; Sretarugsa *et al.*, 2001)

Otra diferencia notable en el proceso de oogénesis en *G. riobambae* es el momento en que aparece la *karyosfera*. Esta estructura es resultado de una agregación de nucléolos, los cuales rodean a los cromosomas y se ubican en el centro de la vesícula germinal. De esta manera, forma una estructura compleja que puede contener material del nucléolo y/u otros cuerpos extra cromosomales (del Pino, 1989; Batalova y Bogoliubov, 2013). La formación de la *karyosfera* refleja una inactivación y descanso del periodo natural y fisiológico del oocito. Este momento es establecido por la desactivación de síntesis de ARN en el periodo máximo de crecimiento del mismo (del Pino *et al.*, 1986; Batalova y Bogoliubov, 2013).

El núcleo se encuentra estructuralmente segmentado y organizado. Éste contiene material genético en donde se implementa la coordinación espacial y temporal de la expresión genética. Está estructurado de manera funcional para que tenga un alto dinamismo con los procesos que ocurren en él (Gavrillov y Razin, 2015; Khodyuchenko y Krasikova, 2014). El núcleo tiene una

gran cantidad de cuerpos celulares con diferencias morfológicas y moleculares entre sí (Gavrilov y Razin, 2015; Grob y McStay, 2014). Los compartimentos nucleares más importantes incluyen a los nucleólos, puntos nucleares, cuerpos Cajal (CBs por sus siglas en inglés) cuerpos de locus de histona (HLBs por sus siglas en inglés) y perlas. También se encuentran fábricas de transcripción y replicación. Estudios donde han reportado presencia de los cuerpos nucleares mencionados anteriormente, se han realizado particularmente en mamíferos, aves, artrópodos y en anfibios. *Xenopus laevis* es el modelo estudiado para los anfibios (Gall y Wu, 2010; Nizami y Gall, 2012; Gavrilov y Razin, 2015; Wang *et al.*, 2016). (Anexo 2) (Anexo 3)

Los cuerpos nucleares independientes de la cromatina se encuentran dispuestos por todo el nucleoplasma. Entre estos, se encuentran los puntos nucleares, que son abundantes en la vesícula germinal de *Xenopus laevis*. Estos cuerpos eventualmente pueden ser transportados a la cromatina (Grob y McStay, 2014; Machyna *et al.*, 2013; Nizami y Gall, 2012; Wang *et al.*, 2016). Los puntos nucleares son compartimentos específicos que poseen componentes que participan en el sistema de corte y empalme (splicing). Los puntos nucleares pueden actuar como centros de reacción donde se coordinan procesos de transcripción, splicing y exportación de ARNm (Gavrilov y Razin, 2015; Kurogi *et al.*, 2014).

Al igual que el citoplasma, el núcleo está organizado por segmentos para facilitar la coordinación eficiente de procesos nucleares. Los nucleólos junto con proteínas nucleares, se encargan de regular el estrés celular (Grob y McStay, 2014; Sleeman y Trinkle-Mulcahy, 2014; Lam y Trinkle-Mulcahy, 2015). También se encargan de regular el ciclo celular, detección y reparación del ADN entre otros procesos relacionados con los productos nucleares (Lam y Trinkle-Mulcahy, 2015).

El nucleólo es el cuerpo nuclear extracromosomal más importante de la vesícula germinal o núcleo, que conjuntamente con el resto de cuerpos nucleares es llamado fábrica de ribosomas (Grob y McStay, 2014; Verdun, 2011; Nizami y Gall, 2012). El nucleólo está constituido por cuerpos de RNA/proteínas el cual no se encuentra delimitado por membranas (Brangwynne *et al.*, 2011; Khodyuchenko y Krasikova, 2014; Sawyer y Dundr, 2016). Los nucleólos componen

grandes e importantes ensamblajes intracelulares cuyas propiedades físicas y rutas de elaboración son pobremente entendidas. Los cuerpos formados por RNA/proteínas se encuentran tanto en citoplasma como en el nucleoplasma celular, y desarrollan papeles importantes en el crecimiento, desarrollo y homeostasis de la célula. (Gall y Wu, 2010; Brangwynne *et al.*, 2011; Lam y Trinkle-Mulcahy, 2015).

Una de las funciones de la vesícula germinal es la de proveer al oocito una gran cantidad de ribosomas, así como también el ser un centro de procesamiento de ARN mediante los nucléolos (Shaw y Brown, 2012). El tamaño de los nucléolos depende del ritmo al que producen amplificados de ADN. Esto también determina la posibilidad de intercambiar componentes en el nucleoplasma entre sí (Brangwynne *et al.*, 2011; Sretarugsa *et al.*, 2001). El nucléolo es una estructura dinámica capaz de adaptarse rápidamente al estado de actividad celular metabólica (Malatesta *et al.*, 2000; Boulon *et al.*, 2010; Shaw y Brown, 2012), puesto que puede adaptar tanto su actividad como su arquitectura. Se ha demostrado que la composición de los nucléolos es acuosa y dependiente de ATP, por lo que los procesos activos mantienen la fluidez del contenido nucleolar (Sleeman y Trinkle-Mulcahy, 2014). Su estructura física se ve dominada por cambios que se dan a gran escala en el proteoma nucleolar como respuesta ante distintos inhibidores metabólicos. Estos efectos pueden deberse a condiciones ambientales y crecimiento celular (Andersen *et al.*, 2005; Brangwynne *et al.*, 2011).

El plasma germinal es una región de mucha importancia en el citoplasma del oocito. Es un ooplasma especializado, que posee ciertos componentes encargados del destino celular de la línea germinal (King, 2014; Kloc *et al.*, 2002; Nijjar y Woodland, 2013). Pertenece a la región METRO (Messenger Transport Organizer), junto con la nube mitocondrial. La nube mitocondrial se encuentra encargada de localizar al plasma germinal junto con sus ARNs asociados al polo vegetal del oocito. La mayoría de ARNs encontrados en los oocitos se asocian a la matriz del plasma germinal o a los gránulos germinales (Schisa, 2012; Kloc *et al.*, 2002; Kloc *et al.*, 2014) llamados anteriormente gránulos corticales (Dumont, 1972). Los gránulos germinales son organelas que usualmente contienen agregados de ARN y ribonucleoproteínas (RNP) (Kloc *et al.*, 2002; Nijjar y Woodland, 2013), únicas del plasma germinal que se

ensamblan durante la oogénesis y sin necesidad de una membrana protectora, al igual que los nucléolos mencionados anteriormente (Brangwynne *et al.*, 2011; Khodyuchenko y Krasikova, 2014; Sawyer y Dundr, 2016).

La formación del plasma germinal es de origen maternal y se da durante la oogénesis. (Sawyer y Dundr, 2016). La ausencia de este plasma germinal en el oocito ocasiona la migración anormal de los gránulos germinales, provocando así el descenso en la cantidad de gránulos germinales o produciendo completa esterilidad, ya que estos se encargan de procesos relacionados con el metabolismo de RNA incluyendo almacenamiento y degradación (Weber y Brangwynne, 2012). Además, los componentes del plasma germinal pueden tener funciones de protección de algunas moléculas, como los gránulos germinales, para evitar que estas moléculas sean utilizadas de manera muy anticipada en el desarrollo (Kloc *et al.*, 2002, 2014; Voronina *et al.*, 2011).

3.2. ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS

Xenopus laevis es considerado un organismo con desarrollo bifásico, donde el embrión se desarrolla en un renacuajo de vida libre acuática con capacidad de alimentarse, para posteriormente desarrollarse en adulto (Callery, 2006; Laudet, 2011).

Gastrotheca riobambae pertenece al grupo de los hemifráctidos. Tiene un marsupio dorsal, lo que la hace llamarse rana marsupial (Elinson y del Pino, 2012; Duellman, 2015). En *G. riobambae* se da el nacimiento de los renacuajos al eclosionar de los huevos, dentro del marsupio. La fertilización es externa y los huevos son ubicados dentro del marsupio de la hembra por parte del macho luego de haberlos fertilizado. La incubación de los huevos dentro del marsupio dura 4 meses (Elinson y del Pino, 2012; Schmid *et al.*, 2012). En el grupo de los hemifráctidos se ha descrito un pérdida del estadio larval, pero hay un reaparecimiento de esta condición en *Gastrotheca* (Elinson y del Pino, 2012; Duellman, 2015).

Xenopus laevis tiene un modo de desarrollo bifásico y rápido con duración de tan solo horas. Comparando esto con *G. riobambae*, se muestra un desarrollo lento, de huevos con gran

tamaño. Los embriones se desarrollan al interior del marsupio de la madre y posteriormente los renacuajos de gran tamaño son liberados tras 120 días de incubación (del Pino, 1989; del Pino *et al.*, 2007; Saenz-Ponce, Mitgutsch y del Pino, 2012). La diferencia entre el desarrollo de *X. laevis* y las ranas marsupiales como *G. riobambae* es la capacidad que tienen los huevos para sobrevivir en diferentes ambientes (del Pino *et al.*, 2007; Saenz-Ponce, Mitgutsch y del Pino, 2012).

El desarrollo directo es caracterizado como una de las estrategias reproductivas más exitosas entre los anfibios. En este tipo de desarrollo el embrión crece y nace con morfología del adulto, sin intervención de un estadio larval. Así, los huevos se encuentran modificados con grandes depósitos de yema. Para el caso de los hemifráctidos, necesitan nutrientes suficientes para permitir el desarrollo del embrión como para el proceso embrionario de incubación (Callery, 2006; Saenz-Ponce, Mitgutsch y del Pino, 2012; Farrell, 2015; Duellman, 2015). El desarrollo directo apareció independientemente en 10 ocasiones en el orden Anura, y es evolutivamente más exitosa que la estrategia reproductiva bifásica (Desnitskiĭ, 2004; del Pino *et al.*, 2007; Saenz-Ponce, Mitgutsch y del Pino, 2012).

Eleutherodactylus coqui es una especie con desarrollo directo, con fertilización interna y reproducción terrestre. Muestra fertilización interna y cuidado parental por parte del macho (Townsend *et al.*, 1994). Posterior a la fertilización, los huevos son depositados en la tierra (Elinson y del Pino, 2012; Saenz-Ponce, Mitgutsch y del Pino, 2012). La puesta es protegida por el macho durante alrededor de 3 semanas, hasta el nacimiento de las ranas miniatura (Elinson y del Pino, 2012).

3.3. *Gastrotheca orophylax*

Es una rana marsupial grande, nocturna, arbórea, terrestre y de color verde fosforescente distintivo. Tiene reproducción estacional, con desarrollo directo, e incuba los huevos en un marsupio ubicado en el dorso de la hembra (Duellman y Pyles, 1980; Duellman y Hillis, 1987; Frolich *et al.*, 2005). Se distribuye entre los 2620-2910 m.s.n.m en los bosques nublados primarios y secundarios de las laderas Amazónicas de la cordillera oriental de los Andes en la región norte del Ecuador (provincias Napo a Sucumbíos, Carchi e Imbabura) y al extremo sur de

Colombia (Nudo de Pasto; departamentos de Nariño y Putumayo) (Coloma *et al.*, 2004; Duellman y Hillis, 1987) (Anexo 4). También se ha encontrado en áreas intervenidas, cultivos con bosques naturales a los alrededores. Se la ha encontrado por la noche sobre hojas de *Gunnera* sp. Los cantos de los machos se han escuchado entre enero y julio. Su apareamiento se da fuera del agua, mediante amplexo axilar. Las hembras anidan con alrededor de 12-32 huevos por individuo. Los huevos tienen un tamaño alrededor de 5 - 6.1mm, se desarrollan en 2-3 meses, y luego nacen juveniles de 15.7 – 17.2mm de tamaño (Duellman y Hillis, 1987; Duellman y Pyles, 1980; Frolich *et al.*, 2005).

La población de *G. orophylax* se ha reducido significativamente en las últimas décadas y continúa en declive. Por esto, ahora es una especie poco común en el Ecuador, pese a que hace tres décadas se consideraba como común. Las mayores amenazas para su población son la actividad agrícola, asentamientos humanos y la deforestación, causando la degradación de su hábitat. Otros factores son el cambio climático, los agroquímicos de los pesticidas que se utilizan para las plantaciones de papas y enfermedades que pueden atacar a las poblaciones (Coloma *et al.*, 2004; Ron *et al.*, 2016; UICN, 2016).

Esta especie está catalogada como En Peligro ya que se encuentra en un rango de menos de 5000 km², y su distribución está severamente fragmentada (Coloma *et al.*, 2004; UICN *et al.*, 2016, Ron *et al.*, 2016). Cabe mencionar la total falta de estudios en oogénesis, embriológicos y de la línea germinal de *Gastrotheca orophylax*, especialmente tratándose de anuros hemifrácidos con desarrollo directo. Es por esto que este estudio es necesario, ya que pretende aportar conocimiento de una parte de la estrategia reproductiva de *G. orophylax*. La elaboración de la tabla de oogénesis de *G. orophylax* otorgará la primera contribución al conocimiento de información de oogénesis para su Biología reproductiva proporcionando así nuevos hallazgos para su conservación y mantención *ex-situ*.

4. OBJETIVOS

GENERAL

Elaborar la primera tabla de oogénesis para un anuro hemifráctido mediante el uso de técnicas morfológica-descriptivas.

ESPECÍFICOS

- Elaborar la tabla descriptiva morfológica de la oogénesis de *Gastrotheca orophylax*, en relación al tipo de oogénesis de *Gastrotheca riobambae* y *Xenopus laevis*.
- Aportar información acerca de la gametogénesis, estrategia y época reproductiva de *Gastrotheca orophylax*.
- Proporcionar conocimiento acerca de la mantención y conservación *ex-situ* de un anuro hemifráctido con desarrollo directo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. COLECCIÓN Y MANTENIMIENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Especímenes de *Gastrotheca orophylax* fueron obtenidos en la parroquia de Santa Bárbara, ubicada en la provincia del Carchi a una altura de alrededor 2.688 m.s.n.m. Esta localidad se encuentra en la cordillera oriental. Se encontró hembras en vegetación arbórea, alejadas de cuerpos de agua y al borde de carretera (Anexo 5).

Se mantuvo a los individuos en cautiverio en terrarios de plástico con mallas plásticas, papel absorbente y charcas de agua ozonificada reposada a temperaturas entre 15 y 20°C. Se conservó el ambiente del terrario húmedo rociando agua reposada periódicamente. El cautiverio y manejo de los individuos se basó según los parámetros bioéticos de manutención según normas de la Asociación Americana de Medicina y Veterinaria (Wright y Whitaker, 2001; Laruta *et al.*, 2011, AVMA, 2013).

5.2. EXTRACCIÓN OVARIOS

Se anestesió a las hembras con la solución MS-2222 para realizar la extracción quirúrgica de los ovarios. Se diluyó la solución a una concentración de 0.5% y se ajustó el pH entre 7-7.4. Se realizó una incisión en el cuarto inferior izquierdo de la parte ventral del anfibio (Fig. 1). Una vez que se seleccionó una porción de ovario se conservó en Saline Amphibian Ringer's Solution (SARS), para su examinación previa a la fijación. Posteriormente a la operación se mantuvo a los especímenes en SARS hasta su recuperación (Wright y Whitaker, 2001; Degitz, 2005; Laruta *et al.*, 2011, AVMA, 2013).

5.3. MANTENCIÓN Y FIJACIÓN DE TEJIDOS GERMINALES FEMENINOS

Se obtuvo dos porciones del ovario en SARS, se mantuvo a cada una de ellas en las siguientes soluciones: La primera porción se fijó en solución SMITH'S y permaneció por alrededor de 24 horas a temperatura ambiente. Se almacenó en Formaldehído al 1,5% a 4°C. La segunda porción se fijó en solución MEMFA por alrededor de 12 horas a temperatura ambiente. Se sumergió en Etanol y Metanol al 100% durante un periodo de 30 a 60 minutos para luego ser almacenada a -20°C.

5.4. FIJACIÓN, CORTES HISTOLÓGICOS, MICROFOTOGRAFÍA DIGITAL, ANÁLISIS DE MICROGRAFÍAS

Para clasificar en estadios a los oocitos del tejido extraído del ovario del anuro *Gastrotheca orophylax*, se realizó una descripción morfológica. A su vez, para describir los estadios de oogénesis se clasificó según características morfológicas celulares de tablas de oogénesis previamente ya elaboradas de *Xenopus laevis*, *Gastrotheca riobambae*, *Flectonotus pygmaeus* y *Eleutherodactylus* sp. (Dumont, 1972; Nina y del Pino, 1977; del Pino y Humphries, 1978; Rodríguez *et al.*, 2010). Las placas de los cortes histológicos fijados y sellados del tejido extraído fueron procesadas en el laboratorio del área de patología del hospital Oncológico Solca de Quito. El tejido fue embebido en parafina, cortado por un micrótomo con un grosor de 5µm, y tinturado con eosina-hematoxilina.

Después del proceso de fijación e histología se eligieron a las placas histológicas con mejor presentación y menor deformación. Se fotografió a los oocitos con la cámara "Lumenera USB Scientific camera- Infinity 1" acoplada a un esteroscopio Zeuss. Se fotografiaron a los oocitos grandes mediante el programa "Infinity Analyze Software". Se tomaron alrededor de 10 medidas de cada oocito a partir de fotografías del tejido previo a ser fijado y se realizó un promedio de las mismas. Para los nucléolos se contabilizó el número aproximado encontrado en cada vesícula germinal y se tomó medida del diámetro de los más grandes.

Se midió los diámetros de la vesícula germinal y se fotografió a las estructuras nucleares de los oocitos con el microscopio de Fluorescencia con la cámara Olympus DP72-TWAIN acoplada. Se estimó los valores aproximados de los diámetros de la vesícula germinal con el programa Olympus Cell[®] R: imaging station for life science. Se clasificó según las características celulares, nucleares y presencia de estructuras del citoplasma de la célula. También, se tomó en cuenta las diferencias de las medidas de tamaño, capas de recubrimiento del oocito y núcleo.

6. RESULTADOS

Se analizó las estructuras celulares en alrededor de 24 oocitos de los cuales 21 fueron fotografiados, estos fueron obtenidos de una sola rana adulta (Fig. 1A). Para las medidas de diámetro del oocito se analizaron un total de 15 oocitos, de los 24 extraídos. La porción de ovario observada en la figura. 1B fue dividida en varias porciones para realizar los cortes histológicos y fijar en SMITH'S y MEMFA. En la figura 1B se presenta los estadios (II, III, IV y VI) encontrados según sus medidas del diámetro. En base a la información obtenida de los cortes histológicos de los oocitos, se encontraron seis estadios para la elaboración de la tabla de oogénesis de *Gastrotheca orophylax*. Las medidas en cuanto al diámetro total del oocito y de la vesícula germinal por estadios se resumen en las Tablas 1 y 2.

6.1. ESTADIO II (TEMPRANO):

Para la clasificación del oocito en este estadio, solo se tomó en cuenta las características citoplásmicas, nucleares y celulares. El diámetro de la vesícula germinal encontrada en los cortes tiene un diámetro de $193,90 \pm 135,22 \mu\text{m}$ (Fig. 2A). Se puede observar un contraste en el citoplasma del oocito cerca de la vesícula germinal (v) mostrando la expansión de plaquetas de yema indicado por las flechas negras (Fig. 2B). En el núcleo o vesícula germinal (indicada por la flecha blanca) no se observa la presencia de nucléolos; en su lugar hay estructuras esféricas pigmentadas a lo largo de la vesícula germinal (flecha negra en la figura 2D) (Fig. 2B y 2D). Los oocitos muestran tres capas protectoras que constituyen el oolema. Estas capas se encuentran compuestas por: la teca (T) que contiene colágeno, fibrocitos y pequeños vasos sanguíneos de recubrimiento (no se muestra), y la capa de células foliculares (CF). El citoplasma se presenta homogéneamente granular con pigmentaciones esféricas llamadas gránulos corticales (GC) que son precursores de yema esparcidos por el citoplasma (Fig. 2C).

6.2. ESTADIO II (TARDÍO):

Las medidas fueron tomadas de dos diferentes oocitos. El tamaño aproximado de su diámetro se encuentra entre las 830 – 930 μm . Solo se presenta una vesícula vesícula germinal en

los cortes con un diámetro de $158,57 \pm 6,64 \mu\text{m}$. La consistencia del oolema se observa mayormente compactada debido al aumento de colágeno. La consistencia de la yema es homogénea hacia la periferia del oocito. Durante este estadio la membrana vitelina no recubre de manera continua al oocito (Fig. 3A y 3C) sino hasta el estadio III. Alrededor del núcleo se visualiza la síntesis de yema hacia la periferia del oocito, por lo que se observa una calidad de yema distinta alrededor del núcleo (Fig. 3A y 3B). Se observó que la envoltura nuclear de la vesícula germinal es irregular y que los nucléolos aumentan en cantidad por todo el nucleoplasma en la vesícula germinal (flecha blanca). Los nucléolos pueden tener una estructura estrellada (flecha negra) (Fig. 3B) o una estructura esférica. También se observan inclusiones pigmentadas de diversos tamaños hacia el centro del núcleo (Fig. 3D). A medida que el oocito sigue creciendo los nucléolos se empiezan a posicionar hacia la periferia de la vesícula germinal (Fig. 3D). Las capas celulares protectoras del oolema presentan un mayor grosor. La membrana vitelina (v) a finales de este estadio aparece como una capa inerte, carente de células, de coloración brillante. Esta recubre directamente de manera discontinua al contenido citoplasmático del oocito. La membrana vitelina se nota de manera continua en el estadio III. Las células foliculares (CF) aumentan de tamaño. Hacia la periferia del citoplasma se observan los gránulos corticales (GC), plaquetas de yema (PY) y vacuolas periféricas (alveolos corticales) (AC) (Fig. 3E y 3F).

6.3. ESTADIO III

Se midieron cinco oocitos, el tamaño aproximado de su diámetro se encuentra entre 950 – 1690 μm y el diámetro de la vesícula germinal encontrada en los cortes tiene un diámetro de $198,55 \pm 17,75 \mu\text{m}$ (Fig. 4A y 4B). En este estadio ya es evidente el polo vegetal y animal, debido al posicionamiento de la vesícula germinal (v) que se encuentra hacia el polo animal del oocito. A medida que continúa la vitelogénesis se da la expansión de plaquetas de yema, las cuales continúan fusionándose en el citoplasma. Esto se puede evidenciar en las diferentes calidades de yema (flechas blanca y negra) (Fig. 4A). En la vesícula germinal se observó una gran cantidad de nucléolos con presencia de cromosomas plumosos (c) a través de todo el nucleoplasma. Se puede observar la acumulación de los nucléolos formando la karyosfera (k). Al final del estadio III, en el núcleo los cromosomas empiezan a condensarse y los nucléolos de la

periferia desarrollan vacuolas (flecha blanca) (Fig. 4B). La acumulación de yema hacia el centro del oocito (flecha blanca) forma una franja con menor concentración de yema en la periferia (flecha negra), debido a la formación de nuevas plaquetas de yema (Fig. 4C). La membrana de protección teca (T) se muestra en dos capas, esta es una característica usual en los anfibios. Las células foliculares (CF) son más alargadas debido al proceso de síntesis de yema. Finalmente, la membrana vitelina (V) recubre continuamente al oocito (Fig. 4D).

6.4. ESTADIO IV

Para este estadio se midieron dos oocitos, el tamaño aproximado de su diámetro se encuentra entre las 2150 – 2380 μm y el diámetro de la vesícula germinal encontrada en los cortes tiene un diámetro de $243,38 \pm 53,49 \mu\text{m}$ (Fig. 5A y 5D). En el polo vegetal se observa al plasma germinal (flecha negra) (Fig. 5A). Dentro del plasma germinal se observan pigmentaciones que son mitocondrias y gránulos germinales (Fig. 5B). A medida que continúa la síntesis de yema, ésta se acumula en forma de citoplasma perinuclear en la zona vegetal de la vesícula germinal (Fig. 5C). Los cromosomas plumosos (c) se empiezan a condensar y agrupar conjuntamente con los nucléolos (n) (karyosfera) hacia el centro de la vesícula germinal. De igual manera, se observan estructuras esféricas y de menor tamaño esparcidas por el nucleoplasma alejadas de la karyosfera (Fig. 5C y 5D). En este estadio los vasos sanguíneos que rodean al oocito aumentan en número y son más evidentes (Fig. 5E).

6.5. ESTADIO V

Para este estadio se midieron a tres oocitos, el tamaño aproximado de su diámetro se encuentra entre las 2810 – 4030 μm (Fig. 6A). No se aprecia la vesícula germinal en los cortes histológicos, por lo tanto no se puede proporcionar información del diámetro del núcleo. A lo largo del citoplasma se evidenciaron vacuolas o alveolos corticales de gran tamaño, con un diámetro de 32,75 μm (Fig. 6B). Las células foliculares (CF) tienen una estructura alargada debido a la presencia de una gran cantidad de yema. Se observan gránulos de pigmento ubicados en la periferia del oocito, estos son melanosomas (ME) y gránulos corticales (GC); los que se suelen encontrar cercanos entre sí formando franjas. A medida que la etapa de vitelogénesis

continúa, las plaquetas de yema continúan fusionándose y empiezan a cristalizar su contenido dando lugar a plaquetas bipartitas (flecha negra) (Fig. 6C y 6D). Los alveolos corticales (AC) se encuentran frecuentemente en la periferia y a su vez, la membrana vitelina (V) alcanza su máximo grosor. Al final se observa el plasma germinal del oocito, el cual se encuentra privado de plaquetas de yema (Fig. 6D).

6.6. ESTADIO VI

Para este estadio se analizaron tres oocitos y su tamaño está entre las 6300 – 6600 μm y el diámetro de la vesícula germinal encontrada en los cortes tiene un diámetro de $292,16 \pm 238,03 \mu\text{m}$ (Fig. 7A-7E). Las plaquetas de yema de menor tamaño están ubicadas en el polo animal (flecha negra) mientras que, las de mayor tamaño en el polo vegetal (flecha blanca) (Fig. 7A). Como resultado de la expansión máxima de yema se forma una franja de menor concentración en la periferia del oocito, debido a la incorporación de plaquetas de yema (Fig. 7B). El citoplasma perinuclear (flecha negra) (Fig. 7C y 7D) se encuentra en la zona vegetal de la vesícula germinal. Mientras los estadios de los oocitos avanzaban se observó que los nucléolos fueron disminuyendo en cantidad. En este estadio los nucléolos son de forma esférica y se encuentran ubicados concéntricamente en el nucleoplasma. Se encontraron posibles puntos nucleares, que son estructuras esféricas de menor tamaño que los nucléolos, alejadas de los mismos y esparcidas por todo el nucleoplasma (flecha negra) (Fig. 7E). Los alveolos corticales (AC) se encuentran con más frecuencia en hileras alrededor de la periferia del oocito (Fig. 7F y 7G). El plasma germinal está rodeando de manera discontinua al polo vegetal con un menor grosor que los anteriores estadios (flechas negras) (Fig. 7G y 7H). La membrana vitelina (V) de consistencia delgada junto con la teca (T), constituyen dos capas de mayor grosor. Por último, en la zona del polo vegetal las plaquetas de yema han aumentado de tamaño considerablemente (Fig. 7F-7H).

7. DISCUSIÓN

En general, existe poca información acerca de la oogénesis de anuros siendo este estudio un aporte que se basó en investigaciones ya existentes de *Xenopus laevis*, *Gastrotheca riobambae* y *Eleutherodactylus* spp. (Dumont, 1972; Nina y del Pino 1977; del Pino y Sánchez, 1977; del Pino *et al.*, 1986). Este estudio morfológico de la oogénesis de *Gastrotheca orophylax* analizado a continuación, tiene la finalidad de proporcionar mayor información acerca de su biología reproductiva. Este aporte es de sumo interés ya que la especie *G. orophylax* no solo es una rana marsupial, sino que también presenta desarrollo directo (Duellman y Trueb, 1994; Duellman, 2015; Schmid *et al.*, 2012).

Los oocitos estadio 6 encontrados para *Gastrotheca orophylax* tienen un tamaño entre 4.2 mm- 6.6 mm (Fig. 1B y 7A). A diferencia de *Gastrotheca riobambae* y *Xenopus laevis* que son de 2.8 mm- 3.6 mm y de 1.3 mm respectivamente (Dumont, 1972; del Pino *et al.*, 1986; del Pino, 1989; Desnitskiy, 2012). Los oocitos de *G. orophylax* tienen un gran tamaño debido a la acumulación de reserva de yema para la nutrición embrionaria. Las plaquetas de yema de *G. riobambae* miden entre 12 a 14 μm , en *X. laevis* llegan hasta los 8 a 12 μm de tamaño (del Pino, 1989; Desnitskiy, 2012; Saenz-Ponce, Mitgutsch y del Pino, 2012). Mientras que en *G. orophylax* las plaquetas de yema miden entre 12 a 25 μm , debido al gran tamaño de los oocitos y sus reservas de yema. Las estructuras vacuoladas observadas en los estadios V (Fig. 6B) y VI (Fig. 7F y 7G) en el citoplasma de los oocitos de *G. orophylax* se denominan alveolos corticales. Estos vacuolas se encuentran compuestas por mucopolisacáridos que también han sido encontradas en el pez y en la actividad de algunos gránulos corticales en el citoplasma de *Xenopus laevis* (Sretarugsa *et al.*, 2001).

La vitelogénesis comienza en el estadio II en *G. riobambae*, al igual que en *G. orophylax* en ambas especies los oocitos adquieren una coloración blanquesina debido a la formación de plaquetas de yema (del Pino *et al.*, 1986; Desnitskiĭ, 2004). En *Xenopus laevis* este proceso comienza en el estadio III. Tanto en *G. riobambae* como en *X. laevis* los oocitos pre-vitelogénicos corresponden al estadio I. Estos oocitos no exhiben presencia de plaquetas de

yema, por lo tanto presentan un citoplasma translúcido con ausencia de la membrana vitelina. La vesícula germinal se posiciona centralmente con los nucleólos situados hacia la periferia de la misma, con ausencia de cromosomas plumosos (Dumont, 1972; del Pino *et al.*, 1986). En el presente estudio no se encontró oocitos pre-vitelogénicos estadio I, por lo tanto se desconoce características de los mismos.

En los estadios II al IV (830 – 2380 μm) (Figs. 2-5) de *Gastrotheca orophylax* se observó la acumulación de yema en el centro del oocito, sin la llamada zona cortical basofílica (Kemp, 1953). Los oocitos no poseen pigmentación en el polo animal por lo tanto, no se tiñe la zona basofílica. Solo se observa una concentración de plaquetas en la zona cortical. Esto quiere decir que se está efectuando un nuevo ciclo de vitelogénesis al interior del citoplasma (Kemp, 1953; Czolowska, 1969; Sretarugsa *et al.*, 2001).

Los oocitos vitelogénicos (estadios II al V) y post-vitelogénicos (estadio VI) en *Xenopus laevis* se encuentran en un rango de 300-1300 μm (Dumont, 1972). En *Gastrotheca riobambae* los oocitos vitelogénicos (estadios III-VI) se encuentran en un rango entre 400-2100 μm (del Pino *et al.*, 1986). Para *Gastrotheca orophylax* los oocitos vitelogénicos (estadios II-VI) se encuentran entre los 830-6600 μm (Figs. 2-7). Tomando en cuenta el modo de desarrollo bifásico de *X. laevis* y el nacimiento de renacuajos en *G. riobambae* se justifica al gran tamaño de oocitos en *G. orophylax*. La elevada cantidad de yema garantiza un respaldo en cuanto a cantidad de energía necesaria para llevar a cabo la incubación y desarrollo del embrión hasta su nacimiento (Duellman y Pyles, 1980, 2015; Frolich *et al.*, 2005).

Los oocitos de *Gastrotheca orophylax* son mononucleados, al igual que *G. riobambae* y *Xenopus laevis*. No se puede identificar la zona del polo animal-vegetal en los oocitos de *G. orophylax* al igual que en los de *G. riobambae* debido a la ausencia de pigmento en el polo animal. La ubicación del polo animal en *G. riobambae* puede ser distinguida en oocitos estadio VI mediante la visualización en de un punto translúcido el cual contiene a la vesícula germinal (del Pino *et al.*, 1986), al igual que en los oocitos fijados de *G. orophylax*. En cuanto a los fijativos, para los oocitos de *Xenopus laevis* se utilizaron fijativos Carnoy's, Ammerman's, o Rossman's, Formalina en buffer neutral al 10% y Bouin's (Dumont, 1972). Para los oocitos de

Gastrotheca riobambae se usaron los fijativos de Glutaraldehído al 2.5% en buffer fosfato, para oocitos pre-vitelogénicos y fijativo Romeins para oocitos vitelogénicos (del Pino *et al.*, 1986). Los fijativos MEMFA y SMITH'S en los cuales se fijaron indistintamente a los oocitos de *Gastrotheca orophylax* no presentan una reducción en el tamaño del oocito, pero su estructura se vio alterada tras el proceso de fijación. Es por esto, que las medidas realizadas para los estadios se obtuvieron de fotografías del ovario fresco. En este estudio ambos fijativos presentan ser factibles para la conservación de estructuras dependiendo de la técnica de rehidratación previa y posterior a los cortes histológicos.

En el estadio IV de *Gastrotheca orophylax* existe la presencia del plasma germinal (Fig. 5A y 5B). En *Xenopus laevis* el plasma germinal se empieza a formar en los primeros estadios (pre-vitelogénico I, estadio I) junto con la nube mitocondrial o cuerpo de Balbiani, cerca de la vesícula germinal (Kloc *et al.*, 2002; Nijjar y Woodland, 2013). Posteriormente en los siguientes estadios (estadios II-V), el plasma germinal se dirige en dirección vegetal del oocito, ubicando a los gránulos germinales en el ápice del polo vegetal, seguido por fragmentos de la nube mitocondrial desagregada. Finalmente los gránulos germinales y las mitocondrias se ubican en la periferia del polo vegetal del oocito, conformando así el plasma germinal (King, 2014; Kloc *et al.*, 2002, 2014; Nijjar y Woodland, 2013; Schisa, 2012). En el estadio IV de *Gastrotheca orophylax* se pudo determinar al polo vegetal debido al alto contenido de yema proporcionado por plaquetas de gran tamaño y del plasma germinal. De esta manera, la nube mitocondrial es considerada como uno de los primeros marcadores morfológicos de polaridad del oocito e indicador del futuro animal-vegetal (Kloc *et al.*, 2014; Liu, 2006).

En *G. orophylax* el diámetro de la vesícula germinal se encuentra entre las 158-290 μm (Tabla. 2). En *G. riobambae* se encuentra entre los 500-600 μm y *X. laevis* 400- 500 μm . El tamaño de la vesícula germinal en *G. orophylax* es menor que las otras dos especies no obstante, el volumen de los oocitos no se encuentra relacionado con la expansión de la vesícula germinal (del Pino *et al.*, 1986). Además, se debe tener en cuenta que el número de oocitos analizado fue de una sola hembra.

La karyosfera aparece desde el estadio III (Fig. 4B) en *Gastrotheca orophylax* al igual que en *G. riobambae* y se encontró en la vesícula germinal de los estadios III, IV y VI (Figs. 4B, 5C-D, 6B-F) (del Pino *et al.*, 1986; Schmid *et al.*, 2012). La karyosfera observada en *G. orophylax* (Figs. 5C y D) se dispone como un agrupamiento de nucléolos en el centro del núcleo como resultado de la concentración de los cromosomas plumosos en un espacio nuclear (Batalova y Bogoliubov, 2013; del Pino, 1989). La formación de la karyosfera es una característica de una fase de dormancia y suspensión de síntesis de RNA en el núcleo, cuando el oocito alcanza su crecimiento máximo (Schmid *et al.*, 2012). La vesícula germinal en los oocitos tanto de *G. riobambae* como en *G. orophylax*, muestran encontrarse en estado inactivo al presentar la karyosfera mucho antes de que el oocito alcance su crecimiento máximo (del Pino, 1989; Schmid *et al.*, 2012; Batalova y Bogoliubov, 2013). Este hecho coincide con la incubación prolongada en el marsupio que se da en *G. riobambae* (Schmid *et al.*, 2012), al igual que en *G. orophylax*.

Otra característica observada en la vesícula germinal de los oocitos de los estadios (IV y VI) de *G. orophylax* es el citoplasma perinuclear o basofílico en la vesícula germinal (Figs. 5C y 7C y D). Dumont (1972) lo describe como el comienzo de la polarización de la envoltura nuclear en el estadio V de *Xenopus laevis*, donde la envoltura se desplaza a manera de acumulación de plaquetas hacia dirección vegetal de la vesícula germinal, llamado también citoplasma basofílico (Kemp, 1953; Dumont, 1972).

Los nucléolos observados en la vesícula germinal de *Gastrotheca orophylax*, tienen formación irregular (estrellada) en el estadio II (tardío), donde se da el comienzo de la expansión de yema. Los nucléolos se encuentran dispuestos por toda la vesícula germinal (Fig. 3F). En el estadio IV, se observa el citoplasma perinuclear y a los nucléolos con forma estrellada que se encuentran agrupados concéntricamente, mientras que los cromosomas plumosos se ubican hacia el centro del espacio nuclear (Fig. 5C y D). De igual manera, los nucléolos irregulares aparecen en estadios tempranos de *Xenopus laevis* (Sleman y Trinkle-Mulcahy, 2014). Esta forma irregular de los nucléolos se debe a que son estructuras dinámicas que responden ante alteraciones en la actividad metabólica del anuro (Andersen *et al.*, 2005; Brangwynne *et al.*, 2011).

La hembra de la especie *G. riobambae* incrementa el tamaño de los oocitos como consecuencia de la acumulación de plaquetas de yema posterior al nacimiento de los renacuajos; indicando que esta lista para el siguiente ciclo reproductivo. Este proceso es la principal característica metabólica en los oocitos de gran tamaño, al igual que en los oocitos de *G. orophylax* (Schmid *et al.*, 2012).

La cantidad de nucléolos en *G. orophylax* disminuye a medida que los oocitos avanzan en los estadios; al igual que en oocitos de *Eleutherodactylus unistrigatus*, *Flectonotus pygmaeus* y *Xenopus laevis* (Dumont, 1972; Nina y del Pino, 1977; del Pino y Humphries 1978; Rodríguez *et al.*, 2010). Por el contrario en *G. riobambae*, el número de nucléolos aumenta mientras que su diámetro disminuye (del Pino *et al.*, 1986). El número de nucléolos que se registró para *G. orophylax* en un oocito es alrededor de 40, en la vesícula germinal con un diámetro de $198,55 \pm 17,75 \mu\text{m}$ (Fig. 4A y 4B). *G. riobambae* presenta un máximo de 300 nucléolos para un total de siete oocitos y un diámetro de la vesícula germinal entre 500-600 μm . En el caso de *X. laevis* presenta de 1000-1500 nucléolos y el diámetro de la vesícula germinal es de 400-500 μm (Brangwynne *et al.*, 2011; del Pino *et al.*, 1986). Se sugiere que el aumento en la cantidad de nucléolos de oocitos vitelogénicos se debe a la insuficiencia de síntesis de ARNr, como también puede que la velocidad de síntesis y ensamblaje sea especie-específica (Rodríguez *et al.*, 2010).

En los últimos estadios de los oocitos en *G. orophylax* (estadio IV) (Fig. 5C y 5D) y VI (Fig. 7B - E) y *G. riobambae* (estadios IV-VI) los nucléolos se agrupan alrededor de los cromosomas (del Pino *et al.*, 1986). El tamaño de los nucléolos está determinado por eventos de fusión y el ritmo al cual se incorporan componentes proteínicos y de RNA. Por otra parte, el tamaño del nucléolo puede determinar la posibilidad de intercambiar entre sí componentes en el nucleoplasma (Brangwynne *et al.*, 2011).

Además de los nucleólos y cromosomas observados en *Gastrotheca orophylax* (Figs. 3B y 3F, 4B, 5D, 7E) se han encontrado otros cuerpos extracromosomales en la vesícula germinal de *Xenopus laevis* (Gall y Wu, 2010). Estos cuerpos corresponden a las perlas y HLBs los cuales se encuentran asociados y relacionados con la cromatina, estos cuerpos son similares

estructuralmente a los nucléolos (Gall y Wu, 2010; Khodyuchenko y Krasikova, 2014; Nizami *et al.*, 2010). Los nucléolos están asociados con los cromosomas plumosos como se observó en el estadio IV (Fig. 5C). Las perlas también se encuentran asociadas con los cromosomas plumosos en la vesícula germinal de *X. laevis*, pero se diferencian de los nucléolos en la función molecular que desempeñan en el núcleo (Schmid *et al.*, 2012; Nizami *et al.*, 2012). Las perlas son perfectamente esféricas y son predominantes en los oocitos de hembras juveniles de *X. laevis* (Nizami *et al.*, 2012). Por esta razón, puede que exista una cantidad escasa o inexistente de perlas en la hembra adulta de *G. orophylax* analizada en este estudio (Fig. 1A).

En los estadios II-III-IV y VI de *G. orophylax* el nucleoplasma de la vesícula germinal presenta pigmentaciones más pequeñas que los nucléolos (Figs. 2B, 3D, 5D, 7E). Estas pigmentaciones pueden ser puntos nucleares, éstos junto con los cuerpos de Cajal (CBs) son cuerpos nucleares independientes de la cromatina que se encuentran dispersos en el nucleoplasma (Handwerger, 2004; Gall y Wu, 2010; Nizami y Gall, 2012). Además, en cuestión de tamaño, los puntos nucleares comparados con los CBs son bastante pequeños (Gall y Wu, 2010). Estos cuerpos extracromosomales además de los nucléolos podrían encontrarse en el nucleoplasma de la vesícula germinal de *G. orophylax* (Figs. 5D y 7E).

Según los resultados obtenidos se propone la posible presencia de puntos nucleares en la vesícula germinal de *G. orophylax*. Estos se encuentran en el nucleoplasma privado de nucléolos (Fig. 7E). Los puntos nucleares suelen formarse predominantemente en regiones nucleoplásmicas alejadas de territorio cromosómico y otras organelas nucleares. También pueden localizarse en regiones al azar o cerca de genes (Spector y Lamond, 2011; Kurogi *et al.*, 2014). Tanto los CBs como los puntos nucleares dependen de la actividad transcripcional de la célula y juegan roles importantes tanto en la transcripción y procesamiento de ARN en el núcleo (Handwerger, 2004; Kurogi *et al.*, 2014; Gavrilov y Razin, 2015; Wang *et al.*, 2016). Estudios proteómicos han revelado que los cuerpos nucleares poseen naturaleza plurifuncional, la cual puede contribuir al incremento y coordinación de la eficiencia de procesos nucleares además de la compartimentalización del núcleo (Verdun, 2011; Schisa, 2012; Grob y McStay, 2014; Khodyuchenko y Krasikova, 2014).

Tanto los nucléolos como los cromosomas plumosos en la vesícula germinal de *Gastrotheca orophylax* fueron identificados en cuanto a su morfología. Los cuerpos nucleares antes mencionados han sido clasificados y diferenciados de acuerdo a su morfología, composición y función molecular. De la misma manera, se tomó en cuenta su asociación con locus específicos de los cromosomas plumosos en estudios de la vesícula germinal de *Xenopus* (Nizami *et al.*, 2012). No se puede asegurar la existencia de estos cuerpos nucleares en la vesícula germinal de *Gastrotheca orophylax*. Para esto se debería aplicar la metodología necesaria con técnicas de inmunofluorescencia, inmunotinción y examinación mediante inmersión en aceite de la vesícula germinal, las que fueron previamente utilizadas en *Xenopus* sp. (Handwerger, 2004; Nizami *et al.*, 2010; Gall y Wu, 2010; Khodyuchenko y Krasikova, 2014).

8. CONCLUSIONES

La mayoría de las especies del género *Gastrotheca* se reproducen probablemente por temporadas, es decir, una vez al año (Duellman y Pyles, 1980; Duellman, 2015). La especie *Flectonotus pygmeus* presenta el tipo de oogénesis sincrona (del Pino y Humphries, 1978; Schmid *et al.*, 2012) de igual manera que *G. riobambae*, donde solo una agrupación de oocitos alcanza su tamaño máximo en cada temporada de reproducción. Por lo tanto, *G. riobambae*, carece de oocitos de estadios intermedios (IV-V) (del Pino *et al.*, 1986; Schmid *et al.*, 2012).

Gastrotheca orophylax pertenece a la familia Hemiphractidae, dentro de la cual existen modos de reproducción de desarrollo directo como larvario. Estudios filogenéticos demuestran que el modo de reproducción de desarrollo directo es basal dentro del género *Gastrotheca*. En la familia Hemiphractidae existen modos de reproducción con estadios larvarios de vida libre pero dependientes de alimento como es el caso de *Flectonotus* sp. (Haas, 2009; Duellman, 2015) a diferencia de *G. riobambae* donde los estadios larvarios son de vida libre pero independientes de alimento (Blackburn y Duellman, 2013; Duellman, 2015).

Se encontraron seis estadios en la oogénesis de *Gastrotheca orophylax* exceptuando los oocitos pre-vitelogénicos, probablemente por errores de fijación y preparación del tejido. Los oocitos llegan a tener un tamaño de 6.6mm, el que es significativamente mayor en comparación con las especies *Xenopus laevis* y *Gastrotheca riobambae*. *Eleutherodactylus* junto con *Gastrotheca orophylax* son ahora los anuros con modo de reproducción de desarrollo directo que presentan estudios de su oogénesis. Se determinó que la oogénesis entre las especies analizadas como *Xenopus laevis*, *Gastrotheca riobambae*, *Flectonotus pygmeus* y *Eleutherodactylus* es bastante similar en cuestión de morfología y composición celular (Dumont, 1972; Nina y del Pino 1977; del Pino y Humphries 1978; Rodríguez *et al.*, 2010).

No se puede saber con certeza si la oogénesis de *G. orophylax* es sincrona o asincrona, ya que para afirmar se necesita de más registros de individuos y una mayor cantidad de oocitos. Sin embargo, se determinó los estadios de oogénesis en base a una sola hembra. Tampoco se puede

asegurar si el modo de oogénesis es influenciado por el modo de reproducción, ya que se necesitan estudios tanto taxonómicos como moleculares.

La información proporcionada en relación a los resultados obtenidos en el estudio constituye el primer reporte de descripción morfológica y descriptiva de la oogénesis de *G. orophylax*. Siendo así este estudio, el primer registro acerca de la gametogénesis parcial para un anuro hemifráctido con estrategia reproductiva de desarrollo directo. La información acerca de esta especie es muy limitada, sobre todo tratándose de su morfología reproductiva temprana. Los estudios acerca de la oogénesis en los anuros son muy escasos, por lo tanto esta información proporciona un mayor conocimiento sobre su modo reproductivo y estimación de épocas reproductivas.

9. REFERENCIAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Raff, M., y Roberts, K. (2002). *Molecular Biology of the Cell 4th Edition: International Student Edition*.
- Andersen, J. S., Lam, Y. W., Leung, A. K. L., Ong, S.-E., Lyon, C. E., Lamond, A. I. y Mann, M. (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature*, *433*, 77–83. doi:10.1038/nature03207
- AVMA. (2013). *Guidelines for the Euthanasia of Animals*. Schaumburg: American Veterinary Medical Association.
- Batalova, F. M. y Bogoliubov, D. S. (2013). Karyosphere capsule in *Tribolium castaneum* oocytes. *Tsitologiya*, *55*, 798–808. doi:10.1134/S1990519X14020023
- Blackburn, D. C. y Duellman, W. E. (2013). Brazilian marsupial frogs are diphyletic (Anura: Hemiphractidae: Gastrotheca). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *68*. doi:10.1016/j.ympev.2013.04.021
- Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F.-M. y Lamond, A. I. (2010). The Nucleolus under Stress. *Molecular Cell*, *40*, 216–227. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.024
- Brangwynne, C. P., Mitchison, T. J. y Hyman, A. (2011). Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*, 4334–4339. doi:10.1073/pnas.1017150108
- Buschiazzo, J. y Alonso, T. S. (2005). Effect of meiotic maturation on yolk platelet lipids from *Bufo arenarum* oocytes. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, *303*, 813–822. doi:10.1002/jez.a.206
- Callery, E. M. (2006). There's more than one frog in the pond: A survey of the Amphibia and their contributions to developmental biology. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *17*, 80–92. doi:10.1016/j.semcd.2005.11.001
- Coloma, L. A., Ron, S., Lynch, R., Almeida, D. (2004). *Gastrotheca orophylax*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T55349A11297121.en>. Downloaded on 16 September 2016.
- Czolowska, R. (1969). Observations on the origin of the “germinal cytoplasm” in *Xenopus laevis*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, *22*, 229–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5391303>

- Davidson, E. H., y Hough, B. R. (1969). Synchronous oogenesis in *Engystomops pustulosus*, a neotropic anuran suitable for laboratory studies: localization in the embryo of RNA synthesized at the lampbrush stage. *Journal of Experimental Zoology*, 172(1), 25-48.
- Degitz, S. J. (2005). Progress towards Development of an Amphibian-Based Thyroid Screening Assay Using *Xenopus laevis*. Organismal and Thyroidal Responses to the Model Compounds 6-Propylthiouracil, Methimazole, and Thyroxine. *Toxicological Sciences*, 87, 353–364. doi:10.1093/toxsci/kfi246
- Del Pino, E. M y Sánchez, G. (1977). Ovarian structure of the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. *Journal of Morphology*. 153: 153-161
- Del Pino, E. M. y Humphries, A. A. (1978). Multiple nuclei during early oogenesis in *Flectonotus pygmaeus* and other marsupial frogs. *Biological Bulletin*, 154, 198–212.
- Del Pino, E. M., Steinbeisser, H., Hofmann, A., Dreyer, C., Campos, M., y Trendelenburg, M. F. (1986). Oogenesis in the egg-brooding frog *Gastrotheca riobambae* produces large oocytes with fewer nucleoli and low RNA content in comparison to *Xenopus laevis*. *Differentiation*, 32, 24-33.
- Del Pino, E. M. (1989). Modifications of oogenesis and development in marsupial frogs. *Development (Cambridge, England)*, 107, 169–187.
- Del Pino, E. M., Alcocer, I. y Grunz, H. (1994). Urea is Necessary for the culture of embryos of the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*, and is tolerated by embryos of the aquatic frog *Xenopus laevis*. *Develop Growth Differ*, 36, 73–80. doi:10.1111/j.1440-169X.1994.00073.x
- Del Pino, E. M., Venegas-Ferrín, M., Romero-Carvajal, A., Montenegro-Larrea, P., Sáenz-Ponce, N., Moya, I. M., ... Taira, M. (2007). A comparative analysis of frog early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 11882–11888. doi:10.1073/pnas.0705092104
- Desnitskiĭ, A. G. (2004). Evolutionary transformations of ontogenesis in anuran amphibians. *Ontogenez*, 35, 165–70. doi:10.1023/B:RUDO.0000029710.32325.bc
- Duellman, W. E. (2015). *Marsupial Frogs: Gastrotheca & Allied Genera*. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press.
- Duellman W. E. y Hillis, D. M. (1987). Marsupial Frogs (Anura: Hylidae: *Gastrotheca*) of the Ecuadorian Andes: Resolution of Taxonomic Problems and Phylogenetic Relationships. *Herpetologica*, 43, 141–173.
- Duellman, W. E, y Pyles, R.A. (1980). A new marsupial frog (Hylidae: *Gastrotheca*) from the Andes of Ecuador. *Occasional papers of the Museum of Natural History*, 84, 1-13.

- Duellman, W. E. y Trueb, L., (1994). *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press. Maryland.
- Dumont, J. N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology*, 136, 153–179. doi:10.1002/jmor.1051360203
- Elinson, R. P. y del Pino, E. M. (2012). Developmental diversity of amphibians. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1, 345–369. doi:10.1002/wdev.23
- Farrell, P. H. (2015). Growing an Embryo from a Single Cell: A Hurdle in Animal Life. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7, 1–25. doi:10.1101/cshperspect.a019042
- Frolich, L.M., Schultz, N., Almeida, D., y Nogales, F. (2005). *Las Ranas de Los Andes Norte de Ecuador: Cordillera Oriental*. Quito-Ecuador
- Gall, J. G. y Wu, Z. (2010). Examining the contents of isolated *Xenopus* germinal vesicles. *Methods*, 51, 45–51. doi:10.1016/j.ymeth.2009.12.010
- Gavrilov, A. y Razin, S. V. (2015). Compartmentalization of the Cell Nucleus and Spatial Organization. *Molecular Biology*, 49, 21–39. doi:10.1134/S0026893315010033
- Gilbert, F. S. (2010). The Saga of the Germ Line: Gamete Maturation. *Developmental Biology* (pp. 598-600). Sunderland, Massachusetts: Sinauer
- Gilbert, F.S. (2014). The Saga of the Germ Line: Gamete Maturation. *Developmental Biology*. (pp.610-612). Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
- Grob, A. y McStay, B. (2014). Construction of synthetic nucleoli and what it tells us about propagation of sub-nuclear domains through cell division. *Cell Cycle*, 13, 2501–2508. doi:10.4161/15384101.2014.949124
- Haas, A. (2009). Non-feeding and feeding tadpoles in hemiphractine frogs: larval head morphology, heterochrony, and systematics of *Flectonotus goeldii* (Amphibia: Anura: Hylidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 34, 163–171. doi:10.1111/j.1439-0469.1996.tb00822.x
- Handwerger, K. E. (2004). Cajal Bodies, Nucleoli, and Speckles in the *Xenopus* Oocyte Nucleus Have a Low-Density, Sponge-like Structure. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 202–211. doi:10.1091/mbc.E04-08-0742
- Hillers, K. J., Jantsch, V., Martinez-Perez, E. y Yanowitz, J. L. (2015). Meiosis. *WormBook: the online review of C. elegans biology*, 1-54.
- Kemp, N. E. (1953). Synthesis of yolk in oocytes of *Rana pipiens* after induced ovulation. *Journal of Morphology*, 92, 487–511. doi:10.1002/jmor.1050920304

- Khodyuchenko, T. A. y Krasikova, A. V. (2014). Cajal bodies and histone locus bodies: Molecular composition and function. *Russian Journal of Developmental Biology*, 45, 297–312. doi:10.1134/S106236041406006X
- King, M. Lou. (2014). Germ-Cell Specification in *Xenopus*. In *Xenopus Development*. 759. 75–100. doi:10.1002/9781118492833.ch5
- Kloc, M., Dougherty, M. T., Bilinski, S., Chan, A. P., Brey, E., King, M. Lou, ... Etkin, L. D. (2002). Three-Dimensional Ultrastructural Analysis of RNA Distribution within Germinal Granules of *Xenopus*. *Developmental Biology*, 241, 79–93. doi:10.1006/dbio.2001.0488
- Kloc, M., Jedrzejowska, I., Tworzydło, W. y Bilinski, S. M. (2014). Balbiani body, nuage and sponge bodies - The germ plasm pathway players. *Arthropod Structure and Development*, 43, 341–348. doi:10.1016/j.asd.2013.12.003
- Kurogi, Y., Matsuo, Y., Mihara, Y., Yagi, H., Shigaki-Miyamoto, K., Toyota, S., ... Tani, T. (2014). Identification of a chemical inhibitor for nuclear speckle formation: Implications for the function of nuclear speckles in regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446, 119–124. doi:10.1016/j.bbrc.2014.02.060
- Lam, Y. W. y Trinkle-Mulcahy, L. (2015). New insights into nucleolar structure and function. *F1000Prime Reports*, 7, 48. doi:10.12703/P7-48
- Laudet, V. (2011). The Origins and Evolution of Vertebrate Metamorphosis. *Current Biology*, 21, 726–737. doi:10.1016/j.cub.2011.07.030
- Laruta, H. E., Escobar, P. X. y Sarzuri, D. (2011). Bioética en la investigación con animales. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 9, 410-419.
- Liu, X. J., (2006). *Xenopus protocols: Cell Biology and Signal Transduction*. Springer Science & Business Media. Ottawa: Ontario.
- Machyna, M., Heyn, P. y Neugebauer, K. M. (2013). Cajal bodies: where form meets function. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 4, 17–34. doi:10.1002/wrna.1139
- Malatesta, M., Gazzanelli, G., Battistelli, S., Martin, T. E., Amalric, F. y Fakan, S. (2000). Nucleoli undergo structural and molecular modifications during hibernation. *Chromosoma*, 109, 506–513. doi:10.1007/s004120000102
- Nijjar, S. y Woodland, H. R. (2013). Localization of RNAs into the Germ Plasm of Vitellogenic *Xenopus* Oocytes. *PLoS ONE*, 8, e61847. doi:10.1371/journal.pone.0061847
- Nina, H. L. y del Pino, E. M. (1977). Estructura histológica del ovario del sapo *Eleutherodactylus unistrigatus* y observaciones sobre el desarrollo embrionario. *Revista Universidad Católica del Ecuador*, 5, 31–41.

- Nizami, Z. F., Deryusheva, S. y Gall, J. G. (2010). Cajal Bodies and Histone Locus Bodies in *Drosophila* and *Xenopus*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 75, 313–320. doi:10.1101/sqb.2010.75.005
- Nizami, Z. F. y Gall, J. G. (2012). Pearls are novel Cajal body-like structures in the *Xenopus* germinal vesicle that are dependent on RNA pol III transcription. *Chromosome Research*, 20, 953–969. doi:10.1007/s10577-012-9320-1
- Rasar, M. A. y Hammes, S. R. (2006). The physiology of the *Xenopus laevis* ovary. *Xenopus Protocols: Cell Biology and Signal Transduction*, 17-30.
- Rodríguez, Y., Sanz, A., Segura, M. D. L. y Lara-martínez, R. (2010). Morfología del ovario en ranas del Género *Eleutherodactylus*. *Acta Microscopica*, 19, 271–278.
- Ron, S. R., Guayasamin, J. M., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A., Ortiz, D. A. y Nicolalde, D. A. 2016. AmphibiaWebEcuador. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/FichaEspecie.aspx?Id=1132>. Fecha de consulta: septiembre 16, 2016
- Saenz-Ponce, N., Mitgutsch, C. y del Pino, E. M. (2012). Variation in the schedules of somite and neural development in frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 20503–20507. doi:10.1073/pnas.1219307110
- Sawyer, I. A. y Dundr, M. (2016). Nuclear bodies: Built to boost. *The Journal of Cell Biology*, 213, 509–511. doi:10.1083/jcb.201605049
- Schisa, J. (2012). New Insights into the Regulation of RNP Granule Assembly in Oocytes *International review of cell and molecular biology*, 295, 233–289. doi:10.1016/B978-0-12-394306-4.00013-7
- Schmid, M. Steinlein, C. Bogart, J.P. Feichtinger, W. Haaf, T. Nanda, I. del Pino, E. Duellman, y W. Hedges, S. (2012). The Hemiphractid Frogs: Phylogeny, Embryology, Life History, and Cytogenetics. *Cytogenetic and Genome Research*, 138. 69–384.
- Shaw, P. y Brown, J. (2012). Nucleoli: Composition, Function, and Dynamics. *Plant Physiology*, 158, 44–51. doi:10.1104/pp.111.188052
- Sleeman, J. E. y Trinkle-Mulcahy, L. (2014). Nuclear bodies: new insights into assembly/dynamics and disease relevance. *Current Opinion in Cell Biology*, 28, 76–83. doi:10.1016/j.ceb.2014.03.004
- Smith, L. D., Xu, W., y Varnold, R. L. (1991). Oogenesis and oocyte isolation. *Methods in cell biology*, 36, 45-60.

- Spector, D. L., y Lamond, A. I. (2011). Nuclear speckles. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3, 1-12.
- Sretarugsa, P., Weerachatanukul, W., Chavadej, J., Kruatrachue, M. y Sobhon, P. (2001). Classification of Developing Oocytes, Ovarian Development and Seasonal Variation in *Rana tigrina*. *ScienceAsia*, 27, 1–14.
- Townsend, D. S. y Stewart, M. M. (1994). Reproductive Ecology of the Puerto Rican Frog *Eleutherodactylus coqui*. *Journal of Herpetology*, 28. doi:10.2307/1564677
- Verdun, D. (2011). Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus*, 2, 189–194. doi:10.4161/nucl.2.3.16246
- Voronina, E., Seydoux, G., Sassone-Corsi, P. y Nagamori, I. (2011). RNA Granules in Germ Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, 2774–2774. doi:10.1101/cshperspect.a002774
- Wang, Q., Sawyer, I. A, Sung, M.-H., Sturgill, D., Shevtsov, S. P., Pegoraro, G., ... Dundr, M. (2016). Cajal bodies are linked to genome conformation. *Nature Communications*, 7, 10966. doi:10.1038/ncomms10966
- Weber, S. C. y Brangwynne, C. P. (2012). Getting RNA and Protein in Phase. *Cell*, 149, 1188–1191. doi:10.1016/j.cell.2012.05.022
- Wolpert, L. y Tickle, C. (2011). Principles of Development. Kendallville: Oxford University Press.
- Wright, K.M. y Whitaker, B. R. (2001). Amphibian Medicine and Captive Husbandry. Clinical Techniques (pp. 115-121). Malabar. Florida.
- Zickler, D. y Kleckner, N. (2015). Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7, 1–26. doi:10.1101/cshperspect.a016626

FIGURAS

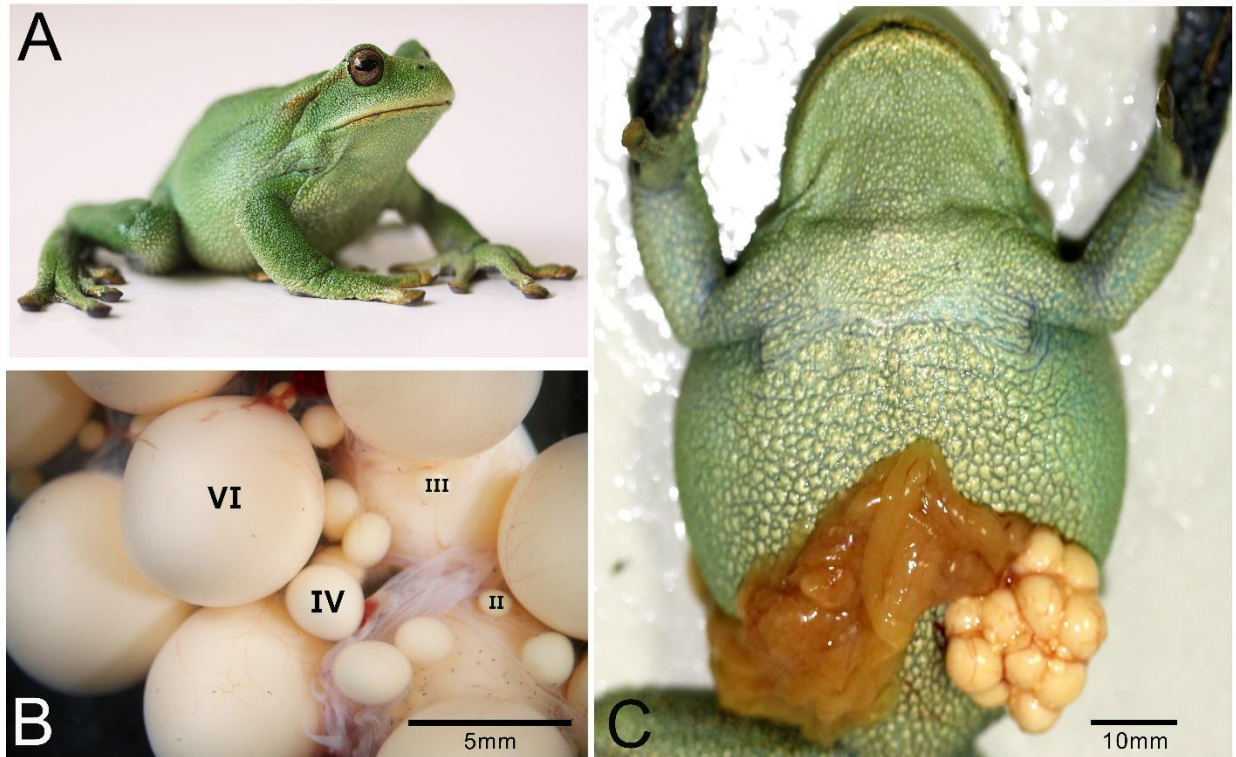


Figura 1. *Gastrotheca orophylax* (A) Hembra adulta de la que se obtuvo los oocitos analizados para este estudio. (B) Ovario adquirido en fresco. Oocitos (estadios II, III, IV y VI) extraídos bajo estereoscopio de disección sumergidos en solución salina SARS. (C) Extracción del ovario izquierdo del cuarto inferior del anfibio mediante el procedimiento quirúrgico que se llevó a cabo para la ovariectomía. Estos oocitos fueron utilizados para la fijación y posterior tinción.

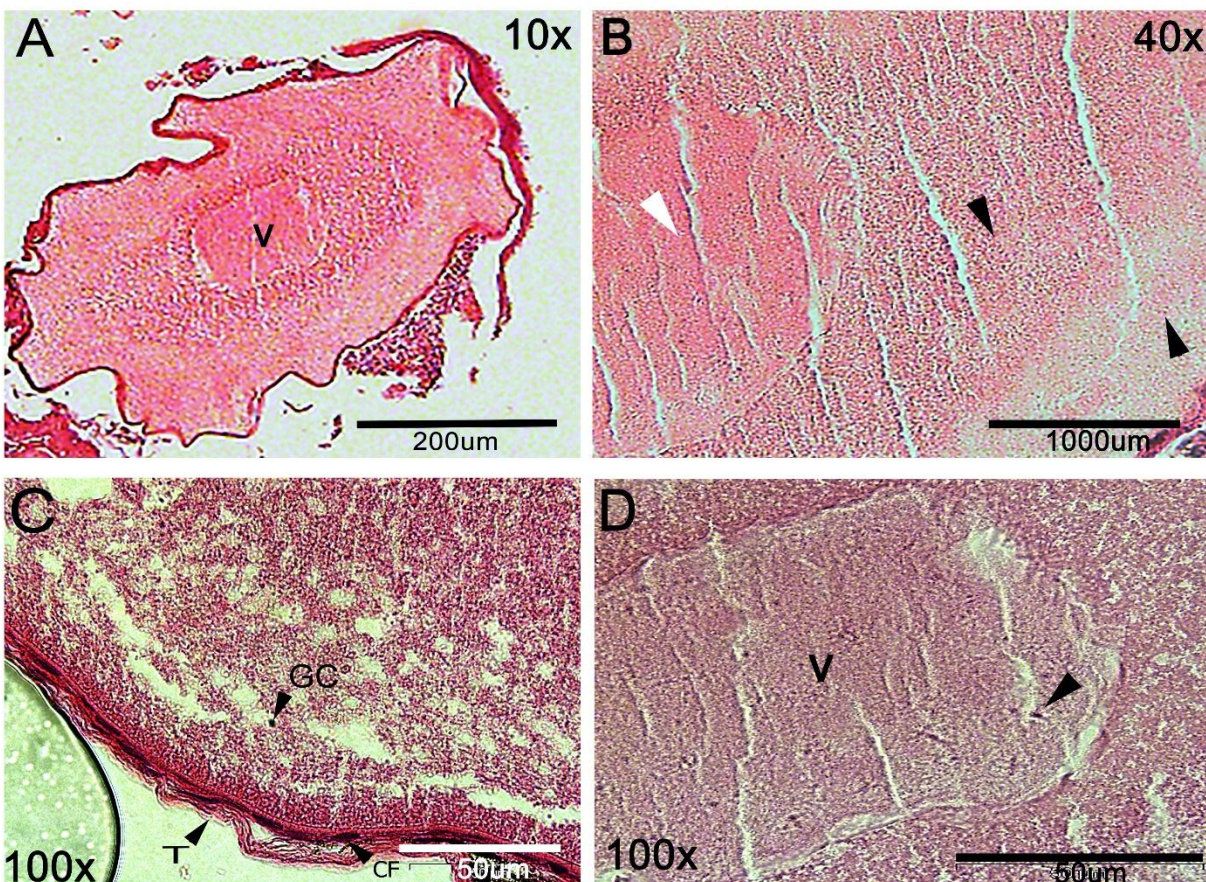


Figura 2. Oocitos Estadio II (temprano) Oocitos tinturados con eosina-hematoxilina. **(A)** Núcleo o la vesícula germinal (v) situada la posición central del oocito. **(B)** Sección de citoplasma de yema adyacente al núcleo indicada por las flechas negras. Las flechas negras muestran la presencia de diferentes tipos de yema. La fotografía es magnificación del mismo oocito de la figura A. **(C)** Periferia del citoplasma recubierto por la Teca (T), seguida de esta capa, se encuentra la capa las células foliculares (CF) y los gránulos corticales (GC) ubicados en la periferia citoplasma. **(D)** Sección diferente del oocito de la figura A, la flecha blanca indica pequeñas estructuras esféricas a lo largo de la vesícula germinal (v). Vesícula germinal (v), Teca (T), células foliculares (CF), gránulos corticales (GC).

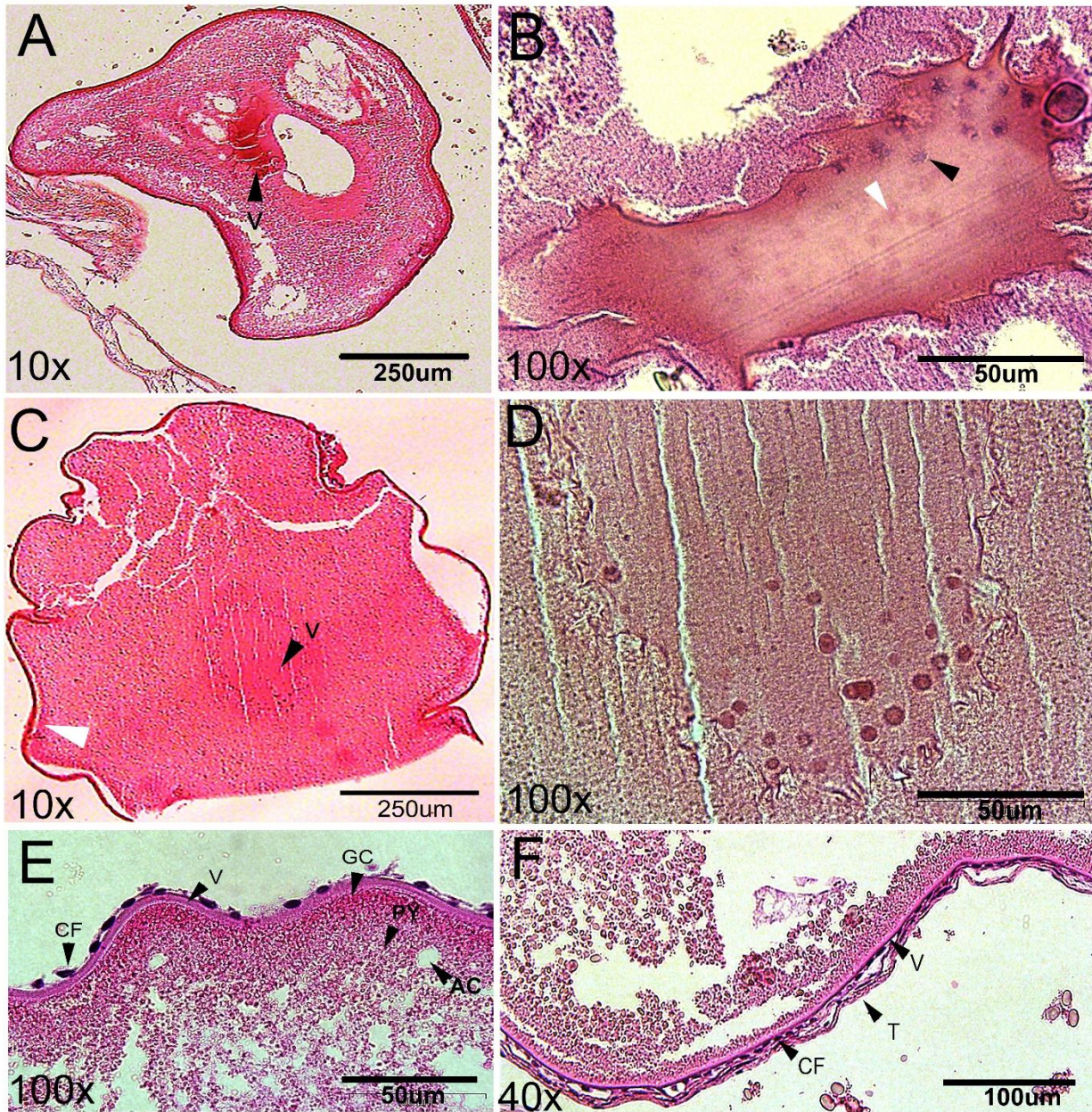


Figura 3. Oocitos Estadio II (tardío) (A) La vesícula germinal (v) está posicionada en el centro, la yema se encuentra dispersa por el citoplasma excepto en secciones adyacentes a la vesícula germinal, donde la calidad de yema es diferente del resto del citoplasma. (B) Corte de la vesícula germinal de una sección diferente del oocito mostrado en la figura A. Los nucléolos están posicionados a lo largo del centro de la vesícula germinal indicados por la flecha blanca y los que tienen un contorno estrellado están indicados por la flecha negra. También existe la presencia de yema al parecer ausente de plaquetas de yema rodeando al núcleo. (C) Oocito con vesícula germinal posicionada centralmente en el oocito (v), la envoltura indicada por la flecha blanca tiene un mayor grosor. El corte indicado es parcial puesto que se desprendió tras el proceso histológico. (D) Contorno irregular de la vesícula germinal, los nucléolos se encuentran en la periferia del núcleo y también pequeños pigmentos están esparcidos a lo largo del núcleo. (E) Periferia del citoplasma de una sección distinta de la imagen A y C. El grosor de la membrana vitelina (V) aumenta como también el de las células foliculares (CF). En la periferia del citoplasma se ubican gránulos corticales (GC), vacuolas periféricas llamadas alveolos corticales (AC) y plaquetas de yema (PY). (F) Sección de la periferia del citoplasma de un oocito que no se muestra en la figura. La Teca (T) aumenta en grosor, junto con las células foliculares. vesícula germinal (v), membrana vitelina (V), células foliculares (CF), gránulos corticales (GC), alveolos corticales (AC), plaquetas de yema (PY), Teca (T).

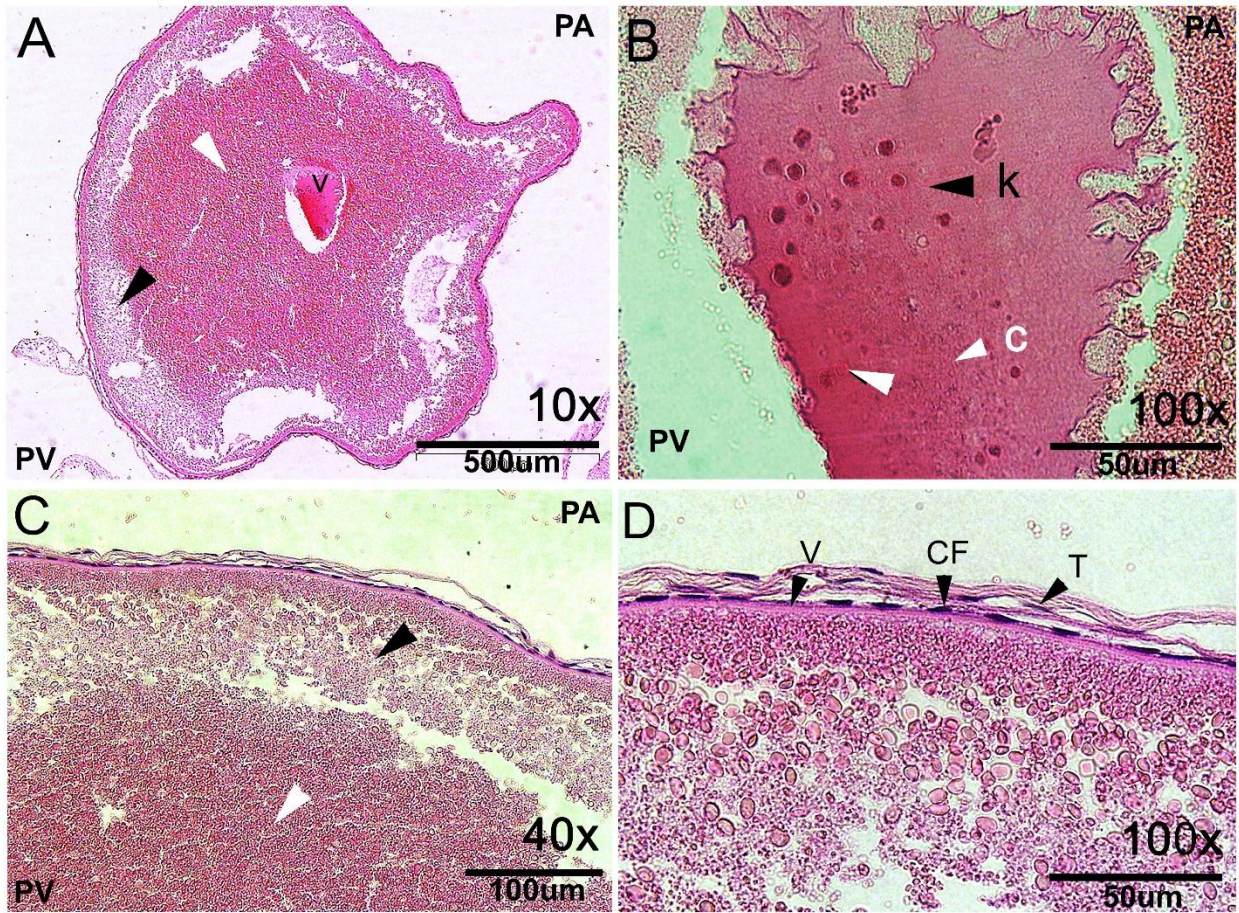


Figura 4. Oocitos Estadio III (A) La vesícula germinal está posicionada hacia el polo animal del oocito (PA). La distribución de la yema tiene una calidad más concentrada hacia el centro del citoplasma señalada por la flecha blanca. Mientras que la flecha negra indica la expansión de yema en el citoplasma hacia la periferia. **(B)** El corte de la vesícula germinal corresponde a una sección distinta del corte del oocito mostrado en la figura A. Se evidencia a nucléolos de gran tamaño y cromosomas plumosos (c). Se indica también una conglomeración de nucléolos formando la karyosfera (k). La flecha blanca muestra a una vacuola desarrollada por nucléolos periféricos. El contorno del núcleo es estrellado con compartimentos de forma ovalada rodeada de un espacio vacío carente de yema. **(C)** Corte de la misma sección del oocito de la figura A, pero de diferente sección a la figura B. Las flechas indican las dos clases diferentes de yema, la flecha blanca indica a la expansión de yema llamada síntesis periférica de yema y la flecha negra indica la franja compuesta por la formación de nuevas plaquetas de yema. **(D)** Esta sección es del mismo corte del oocito de la figura C. La Teca (T) se muestra en dos capas, las células foliculares (CF) se observan un poco más distanciadas y alargadas, y la membrana vitelina (V) es bastante evidente. Se observa a plaquetas de yema formadas debido al proceso de síntesis de yema. Polo Animal (PA), Polo Vegetal (PV), cromosomas plumosos (c), karyosfera (k), Teca (T), células foliculares (CF), membrana vitelina (V).

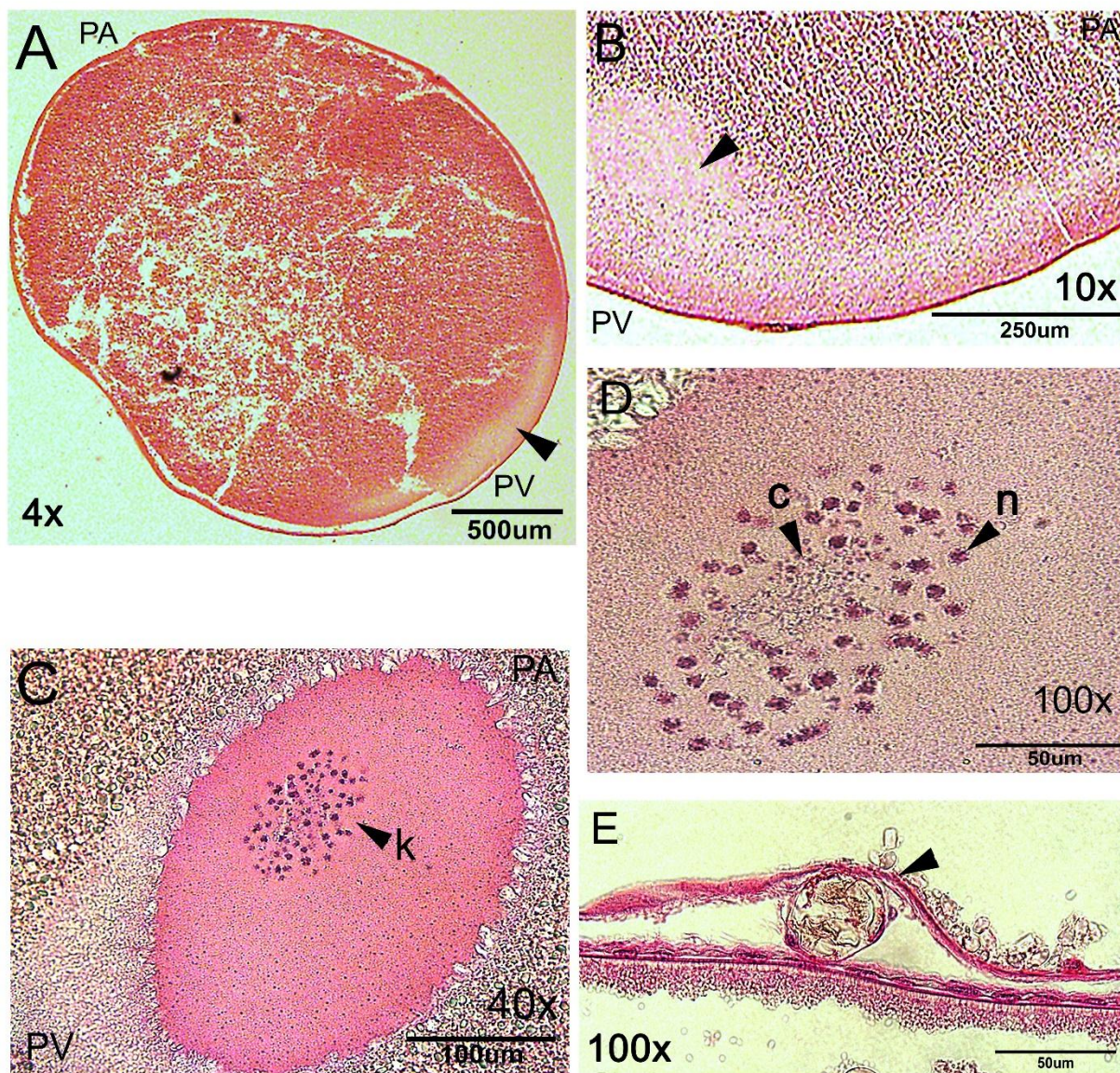


Figura 5. Oocitos Estadio IV (A) Se puede determinar a los polos animal (PA) y vegetal (PV) por la consistencia de la yema en extremos opuestos del oocito y el plasma germinal indicado por la flecha negra localizado en el polo vegetal (PV). **(B)** Este corte es de una sección diferente del oocito mostrado en la figura A. El plasma germinal se indica por la flecha negra. **(C)** El corte de la vesícula germinal es de un oocito diferente al de la figura A. Las diferentes calidades de yema rodean a la vesícula germinal (citoplasma perinuclear). Los nucléolos se agrupan formando la karyosfera (k), mientras que se observan estructuras esféricas de menor tamaño llamadas puntos nucleares ubicadas a lo largo del nucleoplasma. **(D)** El corte es del mismo oocito de la figura C, pero diferente sección. Los cromosomas (c) se concentran hacia el centro de la agrupación, junto con nucléolos (n) y otros cuerpos nucleares de menor tamaño. Los nucléolos de mayor tamaño tienen una apariencia estrellada más que esférica. **(E)** Vaso sanguíneo. En el estadio IV hay un incremento de número y tamaño de los vasos sanguíneos indicados por la flecha negra, seguido por un aumento de grosor de las células foliculares. Polo Animal (PA), Polo Vegetal (PV), karyosfera (k), cromosomas (c), nucléolos (n).

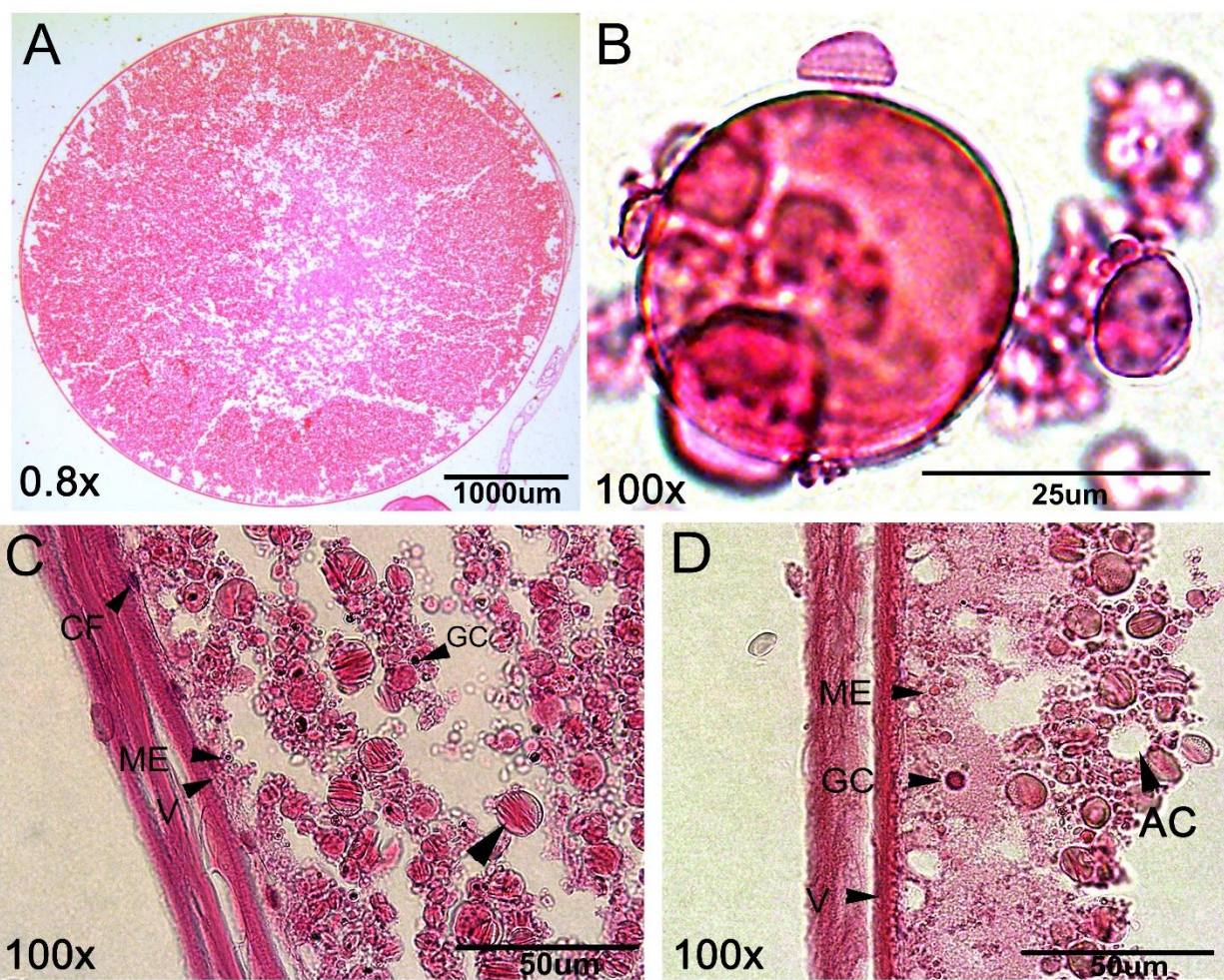


Figura 6. Oocitos Estadio V (A) Oocito fotografiado con estereoscopía de disección, con un diámetro de 4192,39 μm . La expansión de yema es homogénea además en este corte no se encontró a la vesícula germinal, es por esto que no se puede ubicar a los polos animal y vegetal. (B) Vacuola o alveolo cortical, estas se ubican en distintas posiciones en el citoplasma del oocito. (C) Corte de un oocito diferente de la figura A. Las células foliculares (CF), los gránulos corticales (GC) y los melanosomas (ME) son cuerpos pigmentados ubicados mayormente en la periferia del oocito. La flecha negra indica la apariencia bipartita de plaquetas de yema. (D) Corte de un oocito diferente de la figura A y C. Los gránulos corticales (GC) están por encima de los melanosomas (ME) y se observa muy evidente a la membrana vitelina (V). Células foliculares (CF), melanosomas (ME), gránulos corticales (GC), membrana vitelina (V), alveolos corticales (AC).

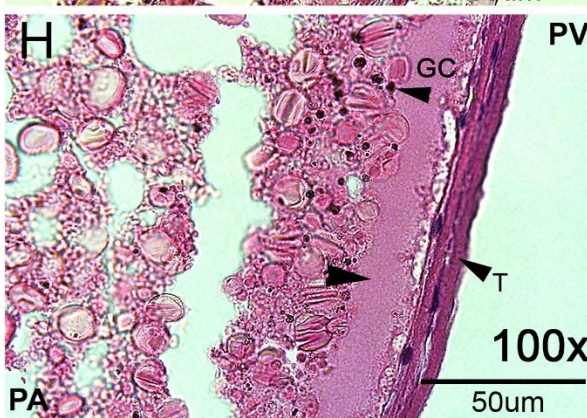
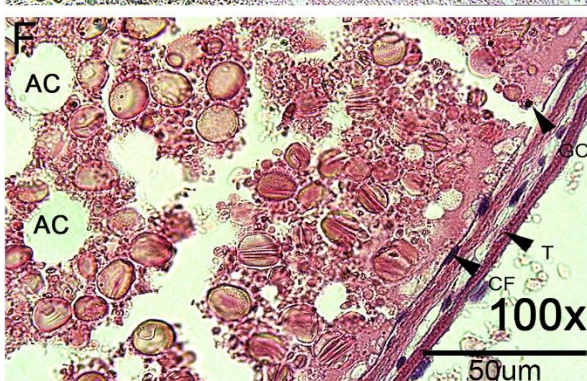
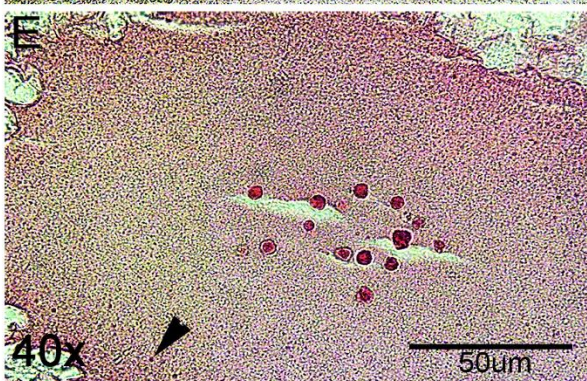
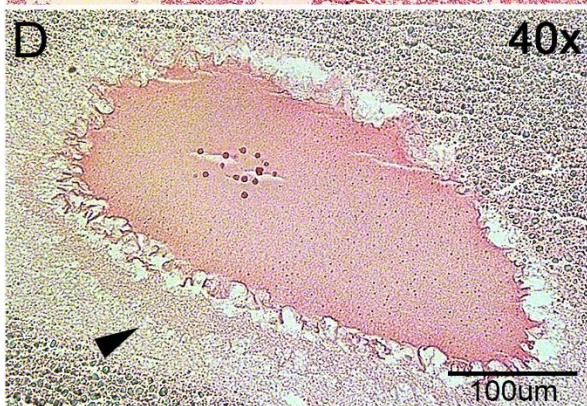
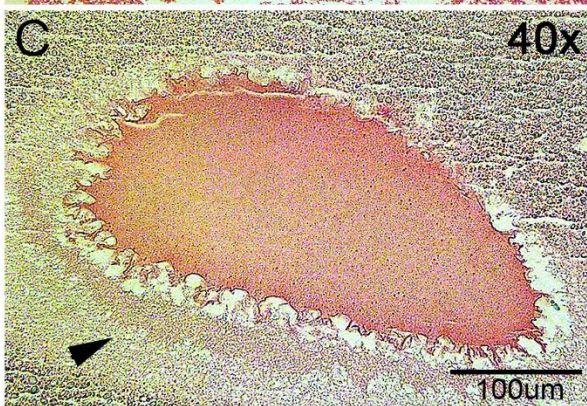
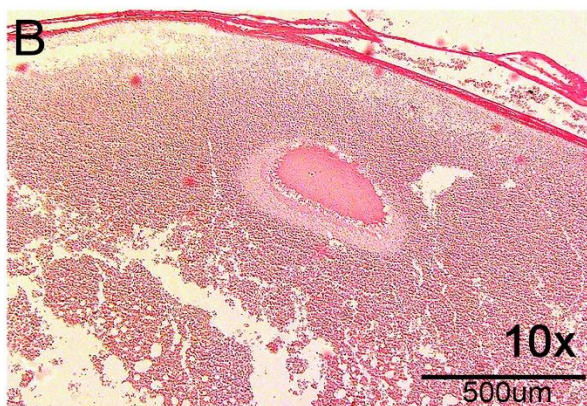
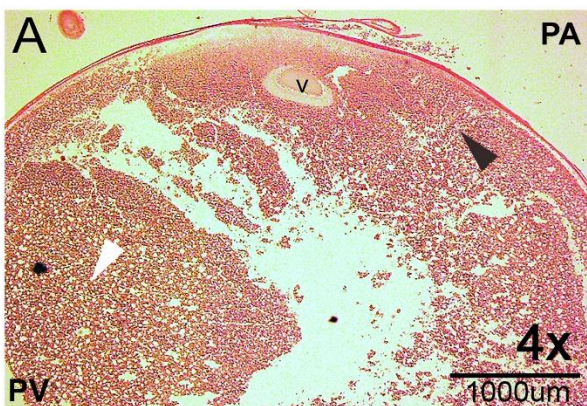


Figura 7. Oocitos Estadio VI (A) La vesícula germinal (v) está ubicada en el polo animal del oocito. La flecha negra señala a las plaquetas de yema de mayor tamaño. La flecha blanca indica la zona del polo vegetal; las plaquetas de yema empiezan a aumentar en tamaño. **(B)** Este corte pertenece a una diferente sección del mismo oocito de la figura A. En la periferia del oocito se ve como la yema se expandió hacia los bordes. **(C), (D)** y **(E)** Son cortes de diferentes secciones del mismo oocito de la figura A. **(C)** y **(D)** La flecha negra señala la acumulación de la yema (citoplasma perinuclear) hacia el polo vegetal de la vesícula germinal. **(E)** Los nucléolos se agrupan concéntricamente en el nucleoplasma, los de mayor tamaño disminuyeron considerablemente en cantidad y se observan de forma más esférica que estrellada. La flecha negra indica a los puntos nucleares esparcidos en el nucleoplasma. **(F), (G)** y **(H)** Son cortes de un oocito diferente de las anteriores figuras. Las células foliculares (CF) son más alargadas en este estadio, la Teca (T) forma dos capas y los gránulos corticales (GC) están ubicados hacia la periferia. La membrana vitelina se exhibe como una capa bastante delgada. **(G)** y **(H)** Las flechas negras señalan al plasma germinal en el polo vegetal. Por último, los alveolos corticales (AC) se observan con mayor continuidad en este estadio. Polo Animal (PA), Polo Vegetal (PV), células foliculares (CF), Teca (T), gránulos corticales (GC), alveolos corticales (AC).

TABLAS

Tabla 1. Medidas obtenidas del diámetro en micras (μm) de oocitos para cada estadio

Estadios oocitos	N	Rango General (μm)
Estadio II (tardío)	2	830-930
Estadio III	5	950-1690
Estadio IV	2	2150-2380
Estadio V	3	2817-4037
Estadio VI	3	6300-6600

Tabla 2. Medidas obtenidas del diámetro de la vesícula germinal en micras (μm) de oocitos para cada estadio

Estadios	N	Promedio de Medida	Desviación estándar (\pm)	Mín	Máx
Estadio II (temprano)	1	193.91	135.22	115.205	396.18
Estadio II (tardío)	1	158.57	6.64	151.32	164.37
Estadio III	1	198.55	17.76	151.57	220.42
Estadio IV	1	243.37	53.50	113.09	280.98
Estadio VI	2	292.16	238.04	47.04	910.18

ANEXOS

Anexo 1.- Tabla de ovogénesis comparando los 6 estadios de *Xenopus laevis* (Dumont, 1972) y *Gastrotheca riobambae* (del Pino *et al.*, 1986). Contempla de cada estadio: diámetro, consistencia del citoplasma, presencia de plaquetas de yema, cromosomas, cantidad aproximada de nucléolos, karyosfera y distinción de polos animal y vegetal.

Stage	<i>G. riobambae</i>	<i>X. laevis</i>
1	Diameter, < 150 μm Translucent cytoplasm Absence of yolk platelets Absence of nuclear cap	Diameter, < 300 μm Translucent cytoplasm Absence of yolk platelets Nuclear cap present
2	Diameter, 150–400 μm Cytoplasm, white-translucent Formation of yolk platelets Lampbrush chromosomes visible Nucleoli are few and large	Diameter, 300–450 μm Cytoplasm, white-translucent Formation of yolk platelets Lampbrush chromosomes visible Nucleoli are numerous, small, and round
3	Diameter, 400–1,100 μm Oocyte is yellow and opaque Nucleoli are numerous In large oocytes, nucleoli cluster near chromosomes forming a karyosphere [21]	Diameter, 450–600 μm Oocyte has dark pigment Nucleoli are more numerous No karyosphere formation
4	Diameter, 1,100–2,100 μm No distinction of animal pole Further clustering of nucleoli in the karyosphere No GVBD after treatment with progesterone in vitro	Diameter, 600–1,000 μm Dark pigment occurs at animal pole No karyosphere formation No GVBD after treatment with progesterone in vitro
5	Diameter, > 2,100 μm No external distinction between animal and vegetal poles GVBD occurs after treatment with progesterone in vitro	Diameter, 1,000–1,200 μm Pigment distinguishes animal from vegetal poles GVBD occurs after treatment with progesterone in vitro
6	Diameter, > 2,100 μm Location of nucleus beneath the surface distinguishes the animal pole GVBD occurs after treatment with progesterone in vitro	Diameter, 1,200–1,300 μm Equatorial band separates animal from vegetal regions GVBD occurs after treatment with progesterone in vitro

GVBD, germinal vesicle breakdown

^a According to Dumont [14]

Anexo 2.- Presencia de cuerpos nucleares aislados de la vesícula germinal de *Xenopus laevis*, el estudio realizado muestra el contenido aislado en solución salina y suspendido en aceite mineral para su observación en microscopía de contraste de fase. Se observan nucléolos (N), cuerpos de Cajal (CBs) y puntos nucleares (S). Las barras indican 10 μm (Gall y Wu, 2010).

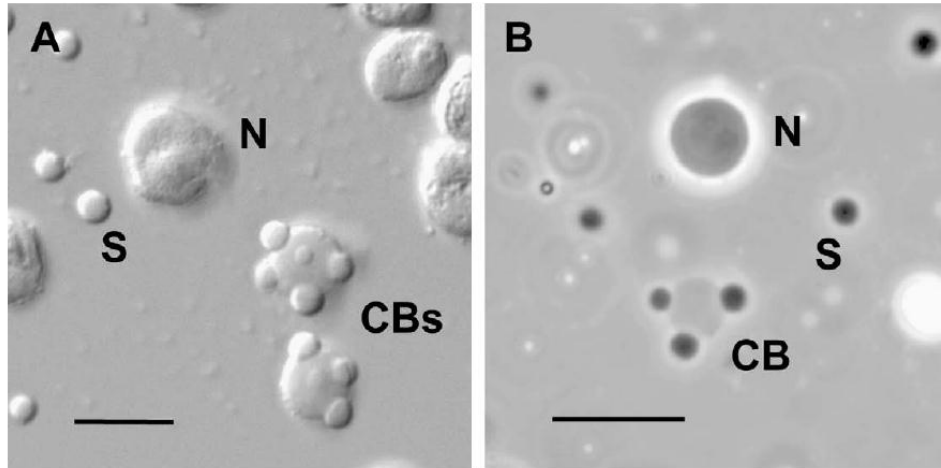


Fig. 6. High magnification image of amplified nucleoli, Cajal bodies, and speckles. (A) Differential interference contrast of nuclear organelles centrifuged onto a microscope slide after isolation in a saline solution. Each GV contains about 1000 nucleoli (N), 50–100 Cajal bodies (CBs) and several thousand interchromatin granule clusters or speckles (S). The contrast is high because the bodies are viewed in a medium of low refractive index. (B) Phase contrast image of unfixed nuclear organelles in an oil-isolated GV. The organelles appear of low optical contrast because they are still in the nucleoplasm, which has a relatively high refractive index. As shown by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) studies, these organelles still exhibit active exchange of macromolecules with the surrounding medium [33,34]. Bars = 10 μm . Panel B reproduced from [29] with permission from Molecular Biology of the Cell.

Anexo 3.— Microscopía de contraste de fases mediante las técnicas de Immunostaining e hibridización *in-situ* fluorescente se muestra los cuerpos nucleares como HLBs (mostrados por las puntas de flecha) y perlas (mostradas por las flechas) asociados a los cromosomas plumosos en oocitos maduros de *Xenopus laevis* y *X. tropicalis* (Nizami y Gall, 2012).

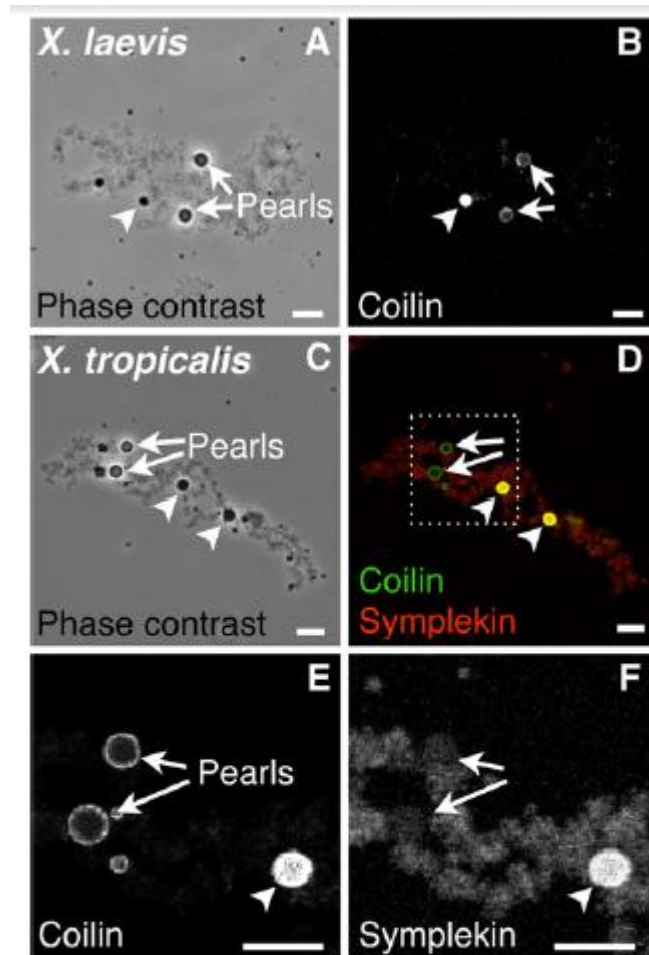
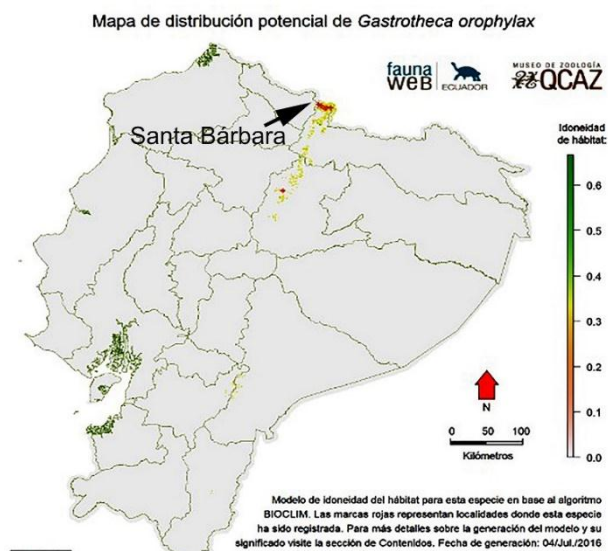
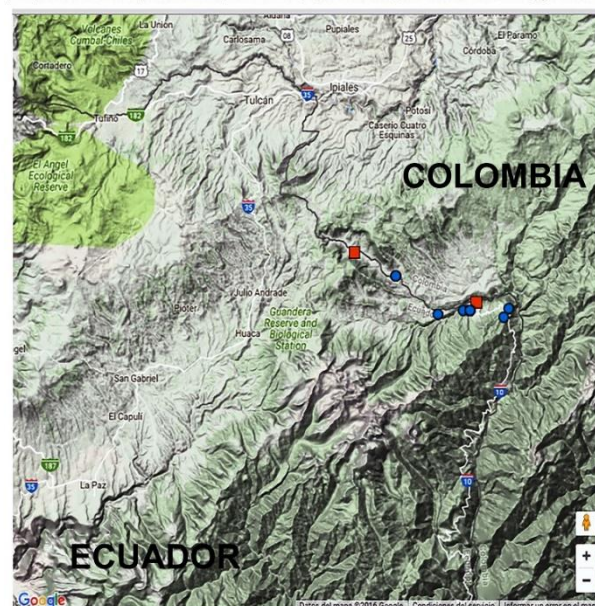


Fig. 2 Pearls are novel coilin-positive bodies attached to specific loci on lampbrush chromosomes. **a–d** Single LBCs in GV spreads from mature oocytes of *X. laevis* (**a, b**) and *X. tropicalis* (**c, d**). **a, c** Phase-contrast images show that pearls are phase-refractile bodies. **b** Antibody stain of coilin, which has a shell-like localization in pearls and a uniform label in HLBs. **d** Antibody stain of coilin (*green*) and an HLB component, symplekin (*red*). **e, f** Enlargement of the *boxed region* in (**d**), separated into single-color channels for coilin (**e**) and symplekin (**f**). *Arrows* point to pearls and *arrowheads* to HLBs. *Bar*, 10 μ m

Anexo 4.- Mapa de localización de la especie *Gastrotheca orophylax* en la cordillera oriental Andina del Ecuador en la provincia del Carchi en la Parroquia de Santa Bárbara. En los mapas de distribución los puntos rojos indica donde la especie ha sido registrada; mientras que los círculos azules indican los registros del Museo de Zoología QCAZ, mientras que los cuadrados naranjas muestran registros de la literatura (Ron *et al.*, 2016).



Disponible bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 no-comercial. Usar citando la fuente, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. La información provista por los modelos no debe ser usada en investigaciones o publicaciones sin citar su fuente y sin que antes haya pasado por un proceso de validación. Este proceso es necesario, entre otras razones, porque la base de datos puede tener errores de identificación y georeferenciación.



DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Michelle Ximena Haro Ramos, con CC. 171825873-2, autora del trabajo de graduación intitulado: “Descripción parcial de la oogénesis de *Gastrotheca orophylax* (Anura, Hemiphractidae).”, previa la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito,

f) _____

CC# 171825873-2