PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Fertilización in vitro, morfología parcial externa de embriones y larvas de *Rhinella marina* (Anura: Bufonidae) y ovulación en *Chiasmocleis bassleri* (Anura: Microhylidae)

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

GABRIELA E. BAUTISTA TOAPANTA

Quito, 2012

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIANCIS BIOLÓGICAS

Certifico que la disertación de la Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Gabriela Elizabeth Bautista Toapanta 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, 4 de Diciembre del 2012

A mi bella familia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por haber apoyado mi sueño de estudiar Ciencias Biológicas. Agradezco a mi madre que ha sido una guía imprescindible a lo largo de mi vida. Agradezco su paciencia con mis despistadas ocurrencias, por su dedicación a formarme dentro de parámetros de respeto y decisión para cumplir mis metas. Pero por sobre todo agradezco a mi madre por todo su inmenso amor hacia mí. A mis hermanos por sonreír conmigo en las buenas y por sostenerme en las malas.

Agradezco al Dr. Oscar Pérez Vaca por haberme acogido en su laboratorio y permitirme realizar este estudio bajo su tutela y proyecto: INVESTIGACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR DE OOGÉNESIS Y FERTILIZACIÓN *IN VITRO* DE ANUROS ECUATORIANOS.

Agradezco a mis lectores: Doctora Eugenia del Pino y Andrés Merino, por su paciencia e interés en la lectura de mi disertación escrita. Por aportar con sus sabios conocimientos y oportunas sugerencias al contenido y redacción final de esta investigación

Agradezco a mis queridos amigos por su cariño, por el compañerismo vivido a lo largo de la carrera. Agradezco especialmente a muchos de ellos que participaron cercanamente en el trayecto de esta investigación. Agradezco su compañía y sus desvelos junto a mi

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN…….1

2. ABSTRACT…….....2

3. INTRODUCCIÓN……..3

4. MATERIALES Y MÉTODOS…….……...…….11

4.1. LUGARES DE COLECCIÓN……...……...…...…….11

4.2. MANTENIMIENTO EN CAUTIVERIO……...……12

4.3. FÓRMULAS DE SOLUCIONES ……...……13

4.3.1. SOLUCIÓN SALINA PARA ANFIBIOS (Amphibian Ringer Solution SAR).....13

4.3.2. FIJATIVO SMITH´S…...…….14

4.3.3. FIJATIVO MEMFA…….14

4.4. ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE FECUNDACIÓN *in vitro* DE *Rhinella marina*……14

4.4.1. SOLUCIÓN MADRE DE PITUITARIA……..…...14

4.4.2. DESCRIPCIÓN DE LA DOSIS PREOVULATORIA ……...……14

4.4.3. TIEMPO ADECUADO DE LA DOSIS PREOVULATORIA …..…….....14

4.4.4. DOSIS OVULATORIA…….…...15

4.5. FERTILIZACIÓN *in vitro* DE *Rhinella marina* ……...…….15

4.5.1. INDUCCIÓN A LA OVULACIÓN EN *Rhinella marina* ……...…….....15

4.5.2. EXTRACCIÓN DE LOS HUEVOS DEL OVISACO……...….16

4.5.3. EXTRACCIÓN DE ESPERMA…….....16

4.5.4. FERTILIZACIÓN……....17

4.6. CUIDADO DE EMBRIONES Y LARVAS DE *Rhinella marina*…….....18

4.7. FIJACIÓN DE TEJIDOS DE *Rhinella marina* Y *Chiasmocleis bassleri*….....18

4.8. OVULACIÓN EN *Chiasmocleis bassleri*…….....19

5. RESULTADOS……...….21

5.1. INDUCCIÓN A LA OVULACIÓN EN *Rhinella marina*……...21

5.2. INDUCCIÓN A LA OVULACIÓN CON 36 HORAS DE TRATAMIENTO PREOVULATORIO EN *Rhinella marina*……...……...22

5.3. FERTILIZACION *in vitro* EN *Rhinella marina* …….…...23

5.4. INDUCCIÓN A LA OVULACIÓN EN *Chiasmocleis bassleri*……...…..24

5.5. MORFOLOGÍA PARCIAL EXTERNA DE LOS ESTADIOS DE DESARROLLO TEMPRANO DE LOS EMBRIONES DE *Rhinella marina* ……..……..... 24

5.5.1. DESCRIPCIÓN DE LA LARVA DE *Rhinella marina* …….....28

6. DISCUSIÓN…….…29

6.1. TIEMPOS DE DOSIS PREOVULATORIAS EN *Rhinella marina* ……...29

6.2. FERTILIZACIÓN *in vitro* EN *Rhinella marina* …….....30

6.3. MORFOLOGÍA PARCIAL EXTERNA DE ESTADIOS DEL DESARROLLO TEMPRANOS DE *Rhinella marina*…….....32

6.4. INDUCCIÓN A LA OVULACIÓN EN *Chiasmocleis bassleri*……...…...35

7. CONCLUSIONES……..……..36

8. LITERATURA CITADA……..……...37

9. FIGURAS…….....46

10. TABLAS ……...…...67

11. ANEXOS……..……75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas de *Chiasmocleis bassleri* ……..……47

Figura 2. Extractos hormonales de pituitaria de *Rhinella marina*, a diferentes concentraciones hormonales…….....48

Figura 3. Lugar de la inyección hormonal en la hembra de *Rhinella marina*…….....48

Figura 4. Ovarios y ovisacos de *Rhinella marina* después de haber sido inducidos hormonalmente con dos señales estimulantes……...…...49

Figura 5. Extracción de los huevos de *Rhinella marina*……..….....50

Figura 6. Extracción de testículos ……...……51

Figura 7. Espermatozoides de *Rhinella marina*…….……...…...52

Figura 8. Fertilización *in vitro* de *Rhinella marina*……...…52

Figura 9. Prueba de Chi cuadrado……53

Figura 10. Ovario de *Rhinella marina* después la ovulación …….....54

Figura 11. Ovulaciones de *Rhinella marina* producto de estimulaciones hormonales con extractos de pituitaria. ……..…….....55

Figura 12. Ovulaciones en *Chiasmocleis bassleri* producto de estimulaciones hormonales …….....……..……56

Figura 13. Corte histológico de huevos de *Rhinella marina* y *Chiasmocleis bassleri* …...57

Figura14. Descripción morfológica de los estadios del desarrollo temprano de *Rhinella marina*……..…….....58

Figura 15. Morfología externa del renacuajo de *Rhinella marina*…….……..……..….65

Figura 16. Tamaño de las especies de estudio …….....66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Localidad de colección de *Rhinella marina,* número de individuos colectados y ensayos realizados …….....68

Tabla 2. Ensayos de tiempos de 24, 36, 48 y 60 horas de dosis preovulatoria en *Rhinella marina*…….....69

Tabla 3. Ensayos de inducción a la ovulación en *Rhinella marina* ……...……..70

Tabla 4. Tabla 4. Tabla parcial del desarrollo de *Rhinella marina*, comparada con las tablas y descripciones de etapas en el desarrollo temprano de anuros, según Nieuwkoop y Faber (1994), Gosner (1960) y Limbaugh y Volpe (1957).....……..71

Tabla 5. Inducción a la Ovulación en *Chiasmocleis bassleri* usando extractos de glándula pituitaria de *Rhinella marina* ……...……....73

Tabla 6. Resultados de inducción a la ovulación en *Rhinella marina* ……...……..74

Tabla 7. Resultados de los 3 últimos ensayos de fertilización *in vitro* de *Rhinella marina* inducidos hormonal con una dosis preovulatoria de 36 horas y una dosis ovulatoria de 12 horas …...……...……...……...…..... 74

Tabla 8. Matriz empleada en el análisis del Chi cuadrado para encontrar diferencias entre los dos tratamientos (36-48 horas) de dosis preovulatoria 74

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Tabla 8. Matriz empleada en el análisis del Chi cuadrado para encontrar diferencias entre los dos tratamientos (36-48 horas) de dosis preovulatoria….....76

Anexo 2. Tabla normal del desarrollo según Gosner 1960 (Duellman *et al*., 1986)……...79

Anexo 3. Tabla de oogénesis de *Rhinella marina.* ……..…..….. 81

Anexo 4. Desarrollo normal de *Bufo valliceps* (Limbaugh y Volpe, 1957).....82

1. RESUMEN

Se ensayaron técnicas de fertilización *in vitro* y estimulación hormonal para la liberación de gametos femeninos mediante extractos glandulares de pituitaria de anuro en *Rhinella marina* y *Chiasmocleis bassleri.* Se indujo a ovulación a *R. marina* con un tratamiento que estuvo compuesto por dos dosis, una preovulatoria y otra ovulatoria. Se fertilizaron los huevos obtenidos y se describieron los estadios del desarrollo temprano de *R. marina*. Se elaboró una breve tabla describiendo los estadios del desarrollo temprano, en base a la comparación con la tabla normal del desarrollo de *Xenopus laevis*. Se obtuvo información como tiempos de clivaje y tamaño promedio de los embriones, infiriéndose que el tiempo necesario para el desarrollo de embriones en *R. marina* es mayor que en *X. laevis*. La inducción a la ovulación de *C. bassleri* fue exitosa tanto con el tratamiento de dos dosis: "preovulatoria" y "ovulatoria"; así como con una sola dosis "preovulatoria". Se ensayaron variaciones en los tiempos de estos tratamientos para *C. bassleri* obteniendo ovulación en todos ellos. Los huevos de *C. bassleri* presentan un diámetro aproximado de 900 µm y son más pequeños que los huevos de la rana *X. laevis* (1.200 – 1.300 µm) y *R. marina* (1.500 µm).

Palabras clave: desarrollo temprano, extractos glandulares, inducción a la ovulación y pituitaria

2. ABSTRACT

In vitro fertilization techniques and hormonal stimulation were tested for female gamete release using anuran pituitary gland extracts in *Rhinella marina* and *Chiasmocleis bassleri*. Ovulation was induced to *R. marina* with two doses, one preovulatory and one ovulatory. The Obtained eggs were fertilized and early development stages of *R. marina* were described. A developmental normal table was made, based on the comparison to development normal table for the development of *Xenopus laevis*. Information as cleavage times and average size of the embryos were obtained, inferring that the time required for the development of embryos in *R. marina* is longer than in *X. laevis*. The ovulation induction in *C. bassleri* was successful with two doses treatments: "preovulatory" and "ovulatory" as well as with a single doses treatment: "preovulatory". Variation in time for this treatment on *C. bassleri* was assessed resulting in ovulation in all of them. Eggs diameter for *C. bassleri* measured aprox. 900 µm. They are smaller than *Xenopus laevis* eggs (1.200 – 1.300 µm) and *R. marina* (1.500 µm).

Key words: anuran pituitary, early developmental, gland extract y ovulation induction

3. INTRODUCCIÓN

Experimentos usando embriones de anfibios han sido el camino para entender las señales en el desarrollo temprano de otros vertebrados (Gilbert, 2005). Esto se debe a la posibilidad de obtener embriones en todas las etapas del desarrollo temprano, por ejemplo en la rana modelo de la Biología del Desarrollo *Xenopus laevis*. Estas características han hecho posible la construcción de mapas de destino y la micro manipulación de embriones (Sive *et al.*, 2000). Mediante fertilización *in vitro* se puede obtener mayor control sobre la información de los estadios iniciales en el desarrollo embrionario. *Xenopus laevis.* Las hembras pueden ser inducidas a ovular durante todo el año en respuesta a inyecciones hormonales y por ende se puede obtener embriones en cualquier época del año. Sin embargo, el uso de este modelo biológico es costoso y demanda grandes recursos para su mantenimiento en el laboratorio (espacio y tiempo). A esta especie le lleva de 1 a 2 años alcanzar la madures sexual (Gilbert, 2005).

La propuesta de este estudio es probar las respuestas ovulatorias de *Rhinella marina* y *Chiasmocleis bassleri* mediante la estimulación con extractos de glándula pituitaria inter e intraespecífica de anuro. Además de fertilizar de los huevos de *R. marina* y describir sus estadios tempranos. La rana *Rhinella marina* conocida como el sapo de la caña es una especie cosmopolita debido a su amplia distribución. La IUCN la categoriza como especie de preocupación menor desde el año 2004 por su alta tolerancia a hábitats degradados, gran capacidad de colonización y ser una especie altamente invasiva (Solís *et al*., 2008). Por su amplia distribución y resistencia se puede conservar individuos en el laboratorio para realizar diferentes estudios, en este caso particular, la ovulación y fertilización *in vitro*.

Rhinella marina se encuentra dentro de la familia Bufonidae, a lo largo del tiempo se le ha atribuido diversos sinónimos tales como: *Bufo angustipes* Taylor y Smith, 1945; *Bufo marinus* Cei *et al*., 1968; *Bufo pythecodactylus* Rivero, 1961 entre otros nombres

(Solís *et al*., 2008). Hasta el año 2007, el nombre válido para este sapo fue *Bufo marinus*, pero estudios taxonómicos recientes y revisiones filogenéticas lo han colocado en el género Rhinella, que junto con otros 85 miembros forman uno de los clados más numerosos de bufónidos de Sudamérica (Castillo y Arteaga-Navarro, 2011). Los huevos y renacuajos de esta especie se desarrollan en agua estancada, estanques temporales, canales y riachuelos por lo cual son considerados plaga (Duellman, 1978; Savage, 2002). En cuanto a su biología reproductiva, se sabe que sus épocas reproductivas están relacionadas con el periodo de lluvias. Las puestas son de gran tamaño, alcanzando alrededor de 35000 huevos en total al año (Clarke y Thomas, 2005). Los huevos se encuentran en largas cadenas gelatinosas, que eclosionan a renacuajos en aproximadamente tres a cinco días. El tiempo en que los renacuajos tardan hasta llegar a la madurez sexual es de 6 a 18 meses, dependiendo de la estación (Krakauer, 1968; Ashton y Asthon 1988; Clarke y Thomas, 2005). Se ha realizado ensayos acerca de la biología reproductiva de *R. marina* como: cambios morfológicos del órgano de bidder debido a estímulos externos (Brown *et al*., 2003; Vargas, 2011) maduración de oocitos mediante estimulación hormonal (Browne *et al*., 2006). Esto podría deberse a que es una especie amigable para el estudio en laboratorio.

La estandarización de procesos de fertilización *in vitro* en *R. marina* nos permitirá tener un punto de comparación experimental para la investigación de especies endémicas del Ecuador. Al conocer sobre dichas técnicas se podría variar los protocolos a fin de aplicarlos en otras especies. Entender la fertilización es clave para la comprensión del desarrollo embrionario (Trujillo-Hernández, 2003). De esta forma se propone aplicar técnicas estandarizadas de inducción a la ovulación en *R. marina* y *C. bassleri* así como la fertilización *in vitro* de *R. marina.* De tal modo que se pueda aportar con procedimientos que permitan ampliar estudios en biología del desarrollo con especies presentes en Ecuador, especialmente especies endémicas.

Algunas de las técnicas que podrían ser de ayuda en el estudio en biología del desarrollo son las conocidas técnicas de reproducción asistida (ART). Dichas técnicas buscan obtener embriones viables que más tarde puedan ser reintroducidos en ambientes naturales (Trujillo-Hernández *et al.,* 2003: Browne y Zippel, 2007). La fuerte aparición de las ART se debe a que las poblaciones de anfibios se encuentran entre los animales menos conocidos y más propensos a desaparecer. En su hábitat natural están experimentando una declinación masiva que ha conducido a la extinción de muchas especies en las últimas dos décadas. Hoy en día, los anfibios constituyen el mayor grupo de animales amenazados en el planeta. A nivel mundial, de las más de 6500 especies descritas e incluidas en la IUCN Lista roja (IUCN, 2011). Unas 1856 especies de anfibios se encuentran en riesgo de extinción, esta cifra constituye un tercio de la población. Otras 168 especies se encuentran ya extintas (Coloma, 2006). Tradicionalmente para hacer frente a estos descensos se ha establecido colonias en cautiverio de las especies en peligro (IUCN *et al.,* 2006), pero la mayor limitación radica en que muchas de estas especies no pueden reproducirse en cautiverio. De tal modo que el mantenimiento de colonias fundadoras es un reto (Coloma, 2006). Ecuador es el tercer país en cuanto a diversidad de anfibios en el mundo. Posee un total de 528 especies formalmente descritas (hasta octubre de 2012). El 42 % del total de estas especies (214) son endémicas para el Ecuador (Ron *et al.,* 2011).

Las tecnologías de reproducción asistida, tales como la estimulación hormonal para la liberación de gametos, el almacenamiento de los mismos y la fertilización *in vitro* son herramientas valiosas para hacer frente a la no reproducción de las especies en cautiverio. Debido a que la reproducción típica de un anuro es externa, el desarrollo de técnicas de fertilización artificial es más bien sencillo en teoría, el paso limitante en el desarrollo de técnicas de fertilización artificial está enfocado en obtener los gametos masculinos y femeninos (Trujillo-Hernández *et al.,* 2003; Browne *et al.*, 2006). Para la inducción de

liberación de gametos generalmente se emplea hormonas humanas purificadas de alto precio monetario tales como: gonadotropina coriónica humana (hCG), la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona liberadora de gonadotropinas GnRH, LHRH o LHRF y la progesterona. (Trujillo-Hernández *et al.,* 2003; Kouba *et al.,* 2009; Browne *et al.,* 2006; Light y Pickooff, 1976). Los protocolos de estimulación con hormonas en anuros, como por ejemplo *Bufo baxteri*, *Bufo boreas*, *Bufo lemur*, *Bufo arenarum*, *Xenopus laevis* (Hollinger y Corton, 1980), *Osteopilus septentrionalis* (Trujillo-Hernández *et al.*, 2003), *Eleutherodactylus coqui* (Michael *et al.*, 2004) entre otros. Estos protocolos, que con frecuencia son especie-específicos, varían con la estación reproductiva de la hembra o con las condiciones de cautiverio, por lo cual son limitadas y limitan su aplicación. (Browne *et al.*, 2006; Kouba *et al.*, 2009). Por ejemplo se determinó que para inducir a la ovulación mediante el empleo de la hormona humana LHRH, en *Bufo baxteri, B. boreas* y *B. lémur,* se requiere de 0.1 µg de LHRH/g de masa corporal, mientras que para estimular a la ovulación en *Eleutherodactylus coqui,* se requiere de 20 µg LHRH/g de masa corporal. La diferencia de concentraciones de hormonas empleadas para inducción entre *E. coqui* y *Bufo baxteri, B. boreas, B. lémur* tomando en cuenta la diferencia de tamaño, varía 29, 9 veces más en el sapo pequeño (Kouba *et al.,* 2009).

Browne y colaboradores analizaron el éxito de diferentes hormonas en la inducción de liberación de gametos y tasas de fertilización en *Bufo baxteri* (Browne *et al*., 2006) Así como en una revisión de Kouba y colaboradores (Kouba *et al.,* 2009), cita ensayos de inducción hormonal (hCG-LHRH) y además se añade dosis bajas llamadas dosis preovulatorias para *B. americanus* y en *B. fowleri*. Estas dosis preovulatorias, señales bajas previas a la dosis ovulatoria, preparan e inician el final de la maduración de los oocitos de tal modo que incrementa el éxito de obtención de los mismos (Kouba *et al.,* 2009). Dichas señales previas van desde 10 % en *X. laevis*, 20-25 % en *B. americanus* y *B. fowleri* el

20 %. El tiempo de espera después de inyectar la dosis preovulatoria varía de 24h-96 horas hasta la dosis ovulatoria (Kouba *et al.,* 2009). También existen estudios sobre inducción a la liberación de gametos usando gonadotropinas homólogas para anfibios (Rugh, 1934a; Browne *et al.,* 2001, Browne *et al.,* 2006; Kouba *et al*., 2009). Por ejemplo, se indujo a la ovulación a una hembra de *Bufo baxteri* con seis pituitarias de machos de *R. marina* homogenizadas en 1 ml de una solución ringer para anfibios (SAR). Este homogenizado se inyectó en el saco linfático y al cabo de 8 a 12 horas se removió huevos del ovisaco (parte final de los oviductos) (Crespo *et al.,* 2009) lo cual indicó que la inducción a la ovulación con pituitarias homologas es un éxito (Browne *et al.,* 2001). De igual forma estudios anteriores dan importancia a las gonadotropinas homólogas tanto como inductores en la ovulación y espermiación como en la maduración de los oocitos en anuros: *Bufo arenarum, Bufo d´orbignyi, Rana pipiens, Euryceabis lineata, Triturus viridescens, Triton crislatus y Steriochilus marginatum* (Rugh, 1934a: Masui, 1967). El uso de pituitaria entre especies de anuros es muy exitoso para la ovulación en los casos donde las hormonas humanas purificadas no tienen éxito. La desventaja de usar la glándula pituitaria es que no pueden estar disponibles comercialmente en todos los países, y además se cree tienen el potencial de transmitir enfermedades (Browne y Figiel, 2008). La pituitaria homóloga de *R. marina* es de gran ayuda para ensayos de desarrollo temprano por su éxito en la inducción a la ovulación.

Morfológicamente *Rhinella marina* posee glándulas paratoideas gigantes, crestas craneales fácilmente reconocibles en adultos, los juveniles pueden ser reconocidos por poseer tubérculos en las palmas, las plantas de los pies y los dedos. Los tamaños generales para machos y hembras son 85–145 mm y 90–241 mm respectivamente (Castillo y Arteaga - Navarro, 2011).Generalmente las hembras son más grandes con respecto a los machos. Son sapos de piel seca y rugosa en la espalda, mientras que el abdomen es liso. La

coloración de la piel presenta tonalidades oscuras: gris, café y oliva, con diferentes patrones de manchas en el dorso y para el abdomen no presenta patrones de manchas más bien un color crema total. Posee ojos grandes con una pupila negra y alargada horizontalmente en un fondo dorado, el iris. Se destaca una protuberancia ósea que va desde la nariz hasta la zona superior de los ojos (Castillo y Arteaga - Navarro, 2011).

De hábitos nocturnos y terrestres: en lugares húmedos y cubiertos, sean éstos cañaverales, sabanas, bosques abiertos y muy usualmente en los patios y jardines de casas. Su gran capacidad de adaptabilidad a ambientes degradados por la intervención antropogénica, hace que se pueda adaptar fácilmente a condiciones de laboratorio. La dieta de este sapo es ampliamente generalista, come desde insectos, ratones y hasta comida enlatada para mascotas (Coloma *et al*., 2006). *Rhinella marina* se distribuye desde 0 hasta 2900 msnm. Es nativa del Sur y Centro América, desde Texas hasta Brasil y Bolivia, pero ha sido introducida en numerosas islas tropicales alrededor del globo terrestre, al ser una especie introducida está afectando negativamente a la fauna nativa ya que son portadores de enfermedades, compiten con otros anfibios menos agresivos, además de ser venenosos en todas sus etapas larvales y adultos por lo cual son un peligro para los depredadores nativos, mascotas y humanos (Clarke y Thomas, 2005). La situación poblacional actual de *R. marina* en Ecuador es alta ya que se ha registrado en las 24 provincias, incluido un registro ocasional en Galápagos (Castillo y Arteaga - Navarro, 2011).

La especie *Chiasmocleis bassleri* habita en los países de Bolivia, Brazil, Colombia, Ecuador y Perú. Esta especie está dentro de las reservas: Parque Nacional Manu, Reserva Pacaya Samiria, Parque Nacional Bahuaja- Sonene en Perú y en Reserva Biológica Limoncocha y El Parque Nacional Yasuní para el Ecuador (Icochea *et al.*, 2004). Su hábitat natural son los bosques húmedos subtropicales o tropicales, tierras bajas, pantanos de agua dulce. La población se encuentra en categoría estable y es abundante en tierra

firme y bosque primario. Generalmente vive en agujeros de árboles, hojarasca, en lagunas y áreas pantanosas comúnmente fosoriales, aunque se las puede encontrar en las ramas de arbustos (Icochea *et al.,* 2004).

Morfológicamente tienen una cabeza pequeña y puntiaguda en comparación del resto del cuerpo, posee ojos muy pequeños. El dorso es de un color azul a café oscuro. El color del vientre es oscuro con manchas "blanco moteado", similar a la coloración de una vaca. (Icochea *et al.,* 2004). Posee una línea blanca que va desde el ojo hasta la parte superior de la extremidad delantera. A diferencia de otras especies del género *C. bassleri* no posee los dedos del pie palmados, este los tiene alargados y bien diferenciados, tiene una clavícula esbelta y reducida que casi no toca el hueso coracoides (Rodríguez y Duellman, 1994) (Figura 1)

Es conocido también que otras especies de la familia Bufonidae son usadas como modelo de investigación en embriología. Tal es el caso de *Bufo arenarum* en Argentina (Pérez- Coll y Herkovits, 1996). En este estudio, previo a la obtención del titulo de Licenciada en Ciencias Biológicas, se propone a *Rhinella marina,* como una alternativa de especie modelo de Biología del Desarrollo debido a su abundancia, amplia distribución y resistencia, ya que se puede obtener los animales fácilmente para ensayar técnicas como inducción a la ovulación y fertilización. Se plantea describir la técnica de inducción a la ovulación usando gonadotropinas intraespecíficas en la especie *Rhinella marina*. De tal manera que se pueda obtener huevos de *Rhinella marina,* para luego realizar fertilizaciones *in vitro.* A partir de las cuales se pretende elaborar una breve descripción morfológica de los estadios tempranos en el desarrollo del embrión y la larva. Además se plantea aplicar técnicas estandarizadas de ovulación de *Rhinella marina* en *Chiasmocleis bassleri,* mediante gonadotropinas interespecíficas. Se buscará aportar con técnicas que permitan

ampliar estudios en biología del desarrollo con especies ecuatorianas y mejorar las técnicas de conservación para anfibios.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. LUGARES DE COLECCIÓN

Para estandarizar métodos de fertilización *in vitro* se utilizaron individuos de *Rhinella marina*. Se capturaron individuos por medio de muestreos de encuentro visual. Se colectó individuos de ambos sexos, maduros sexualmente. Fueron colectados en septiembre del 2009, octubre del 2011 y febrero 2012 en la localidad de El Matal-Jama en la provincia de Manabí (Tabla 1). Esta localidad está ubicada a 5,5 Km de la cabecera cantonal Jama y presenta un clima seco con una temperatura que varía de 24 a 30°C. (Maldonado, 2010). La detección de machos fue posible por el reconocimiento de un tejido más oscuro que presenta la piel del dedo pulgar de las patas delanteras, llamado callo nupcial (Duellman y Trueb, 1986). Para trasladar los sapos hacia el laboratorio en Quito, se los colocó en cajas de espuma flex. Las tapas de las cajas tenían una serie de agujeros, asegurando que el aire entre a las cajas para mantenerlas ventiladas. También se humedeció a las ranas constantemente.

En cuanto a *Chiasmocleis bassleri* todos los ensayos se realizaron en la Estación Científica Yasuní, las colectas fueron en el mes de julio del 2011 y mayo del 2012, se procedió de igual forma que en el caso de *Rhinella marina*. Se realizaron caminatas nocturnas, de ocho metros al lado izquierdo y derecho del sendero “Bariso” (S 00°40.271´ W 076°24,048).Se los transportó hacia el laboratorio D4 ubicado en la Estación Científica Yasuní, dentro de fundas plásticas transparentes para luego ser colocados en terrarios de plástico previo a los ensayos de inducción a ovulación.

4.2. MANTENIMIENTO EN CAUTIVERIO

Se instaló a los ejemplares de *Rhinella marina* en el laboratorio de Biología del Desarrollo 115 de la Escuela de Biología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador en Quito. Fueron minuciosamente inspeccionados, quitando las garrapatas cuidadosamente con pinzas y asegurándonos de extraer por completo el hipostoma, para evitar que quede adherido causando daño. Los individuos fueron separados de acuerdo al sexo, después de la identificación se los colocó en dos cajas plásticas transparentes con dimensiones de 70 cm. de largo x 30 cm. de ancho x 30 cm de alto a las cuales se los llamó terrarios, uno contuvo a las hembras y otro a los machos. Estos terrarios tuvieron una reja plástica de 1 cm de alto en el fondo, sobre ésta se colocó una malla plástica para que la orina caiga y se deposite a la base del terrario y no esté en contacto directo con los animales. Para evitar la desecación del terrario se añadió agua en esta zona. En cada tapa se hizo una abertura y se colocó malla plástica para incrementar el ingreso de aire al interior.

La alimentación tuvo como componente principal grillos, criados en el bioterio del Centro de Investigación y Conservación de Anfibios “CICA” de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Se alimentó a los animales con 15 grillos semanales por cada sapo, distribuidos en tres raciones. Se reforzó la dieta espolvoreando calcio y multivitamínico periódicamente sobre los insectos. Además de los grillos también se los alimentó con carne una vez al mes: ratones pequeños o pedazos de carne de res.

Se limpió los terrarios completamente una vez por semana. Esto consistió en sacar la reja y lavar cada parte del terrario. El agua usada para limpiar fue agua reposada, ya que ésta no contiene cloro. Luego se rearmó el terrario para regresar a los sapos a su lugar. Los recipientes de agua de cada terrario se lavaron y cambiaron tres veces por semana.

4.3. FÓRMULAS DE SOLUCIONES

4.3.1. SOLUCIÓN SALINA PARA ANFIBIOS (Amphibian Ringer Solution SAR) (Whitaker & Wrigth, 2001).

6,6 g	Cloruro de Sodio NaCl
0,147 g	Cloruro de Calcio $CaCl_2$
0,149 g	Cloruro de Potasio KCl
0,2 g	Bicarbonato Ácido de Sodio $NaHCO_3$
1 l	Litro de Agua Destilada

4.3.2. FIJATIVO SMITH´S (Liu, 2006)

Solución A

Dicromato de Potasio al 1 %

Solución B

Ácido Acético al 5 %

Formaldehido al 7,4 %

4.3.3. FIJATIVO MEMFA (Sive *et al.*, 2000)

Para preparar 10 ml de Fijativo MEMFA:

1 ml Solución de MEMFA 10X

1 ml de Formaldehido al 37 %

8 ml de Agua de DEPC

4.4. ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE FERTILIZACIÓN *in vitro* DE *Rhinella marina*

4.4.1. SOLUCIÓN MADRE DE PITUITARIA

Se removió la pituitaria del cráneo de la rana (Teisaire *et al.,* 2010) y mediante pinzas de punta roma (MEDITEC cc) se la retiró y se trasladó a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml que contenía 300 µl de la Solución Salina para Anfibios (SAR) (4.3.1). Se maceró hasta conseguir una homogenización uniforme (Browne y Figiel, 2008; Rugh, 1934a; Sive *et al.*, 2000; Morril *et al.,* 2006). Esta solución contenía el 100 % de la glándula (Figura 2, A).

4.4.2. DOSIS PREOVULATORIA

Se tomó 30 µl de la solución madre con una pipeta de 20 a 200 µl BioPipette y se colocó en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml al cual se aforó a 300 µl con SAR. Así se obtuvo una solución preovulatoria al 10 % del macerado total de pituitaria (Sive*et al.,* 2000). La dosis preovulatoria fue colectada con una jeringuilla de plástico de 1 ml NIPRO Corporation y fue inyectada en la región ventral, intraperitonealmente (Browne *et al.,* 2006) (Figura 3). Se dejó actuar la dosis preovulatoria durante 36 horas antes de la administración de la dosis ovulatoria, 90 % de la glándula (Figura 2, B).

4.4.3. TIEMPO ADECUADO DE LA DOSIS PREOVULATORIA

Se indujo a ovulación mediante estimulación hormonal a hembras de *Rhinella marina.* Se empleó pituitaria de machos y hembras, en tiempos de dosis preovulatoria de 24, 36, 48 y 60 horas (Kouba *et al.,* 2009) (Tabla 2). Se buscó el mejor tiempo que requirió la dosis preovulatoria para iniciar la maduración de los oocitos. Se midió el éxito de cada

tiempo por la cantidad de los huevos viables (vivos) encontrados en los ovisacos. Se analizó estos resultados mediante la prueba de Chi cuadrado.

4.4.4. DOSIS OVULATORIA

Se procedió con la metodología de la sección 4.4.1, a excepción de que para esta dosis final se inyectó intraperitonialmente los 270 µl de la solución madre de pituitaria al 100 % de concentración, es decir el 90 % restante de la glándula pituitaria. Se esperó 12 horas después de esta inyección y subsecuentemente se extrajo los ovisacos del sapo que contenían a los huevos (Kouba *et al.,* 2009) (Figura 4, A). Se realizó una incisión en el vientre a nivel de la pelvis hacia un costado de la línea media para evitar hemorragias debido a cortes de la vena abdominal ventral (Figura 4, B).

4.5. FERTILIZACIÓN *in vitro* DE *Rhinella marina*

4.5.1. INDUCCIÓN A LA OVULACIÓN EN *Rhinella marina*

Se indujo a ovulación en diferentes meses y años desde el 2010 hasta el 2012, todas las pituitarias fueron extraídas de hembras y machos adultos y ensayados en hembras adultas:

A) Se indujo a la ovulación en octubre del 2010, con pituitarias de hembras adultas, en hembras adultas de *R. marina* colectadas en septiembre del 2009, con dos dosis hormonales, una preovulatoria (10 % de la glándula pituitaria) de 36 horas y una dosis ovulatoria (90 % de la glándula pituitaria) de 12 horas. Posteriormente se abrieron a las ranas.

B) En octubre del 2011, se indujo a ovulación a hembras adultas colectadas en octubre del mismo año. Se ensayaron 2 variaciones en el protocolo usado en octubre de 2010: a) se inyectó una sola dosis correspondiente al 100 % de concentración hormonal de la glándula pituitaria y se abrió después de 12 horas de la inyección de la dosis ovulatoria.

b) En una segunda hembra, se ensayó con dos dosis hormonales: preovulatoria y ovulatoria correspondientes a una sola glándula pituitaria. c) El tercer ensayo consistió en inyectar soluciones hormonales de dos pituitarias, una de hembra y una de macho, administradas en dos dosis hormonales: preovulatoria y ovulatoria.

C) Para el mes de noviembre del 2011, se indujo a una hembra con una dosis preovulatoria y una ovulatoria. D) En el 2012, se realizó cinco ensayos de inducción y fertilización, tres en enero y dos en febrero. En uno de los ensayos se indujo con dos pituitarias de hembras. Y en febrero se usó dos pituitarias de machos (Tabla 3).

Todas las hembras inducidas fueron colocadas en terrarios más pequeños de 22,5 x 13,5 x 13 cm. de largo, ancho y profundidad respectivamente. En el cual se colocó papel absorbente doblado ocupando un tercio del fondo. Se añadió la cantidad de SAR suficiente para que quede empapado y que haya aproximadamente 1 centímetro de SAR por encima de la base del terrario (Aguilar *et al.*, 2005).

4.5.2. EXTRACCIÓN DE LOS HUEVOS DEL OVISACO

Se sacrificó al animal aplicando lidocaína en pasta al 10 % en la lengua. Posteriormente se realizó un corte con tijeras de punta fina (MEDITEC cc) en la zona caudal ventral, donde se localizan los ovisacos. Con cuidado de no comprometer ningún vaso sanguíneo, se realizó un corte para remover cada ovisaco (Figura 5, A). Por último se colocaron individualmente las hileras de huevos en cajas petri para su fertilización (Figura 5, B).

4.5.3. EXTRACCIÓN DE ESPERMA

Se sacrificó al animal y se realizó un corte en la región ventral a un costado de la línea media. A continuación, se movieron los órganos (intestinos y estómago

principalmente) y se usó pinzas de punta roma para su manipulación hasta encontrar los testículos derecho e izquierdo (Figura 6, A). Luego se los removió y colocó en SAR (Figura 6, B). Se verificó la motilidad de los espermatozoides mediante una placa observada al microscopio (Figura 7).

4.5.4. FERTILIZACIÓN

En la fertilización de huevos se usó ambos testículos de cada macho. Se realizó la fertilización en seco, esto acorde a protocolos usados por Browne *et al.*, 2006. Se colocó los huevos en diferentes cajas petri, a razón de 50 % de cobertura de cada una, se trató de espaciar en lo posible a las hileras de huevos (Figura 8). Se cortó a la mitad cada testículo y se tomó cada mitad con una pinza, a modo de brocha se esparció los espermatozoides sobre los huevos; se repitió este proceso varias veces por 10 minutos, asegurando que todos los huevos fueran fertilizados repitiendo el proceso de cubrir a los huevos con el testículo. Los huevos expuestos al esperma, fueron cubiertos con agua reposada y se dejaron desarrollar a 17ºC. El agua de las cajas petri fue cambiada dos veces por día. Se eliminó huevos no fertilizados y embriones muertos.

Durante y después de la fertilización se fotografió a los embriones en los diferentes estadios del desarrollo. Para ello se usó un estereoscopio Stemi SV11 ZEISS y una cámara digital Canon PowerShot G9. Las tasas de éxito de fertilización fueron evaluadas a través de porcentajes de clivaje de los embriones que llegaron a estadio 3-6 de acuerdo a la tabla de desarrollo normal de *Xenopus laevis* de Nieuwkoop y Faber, 1994 (Anexo 1). Los estadios 3 – 6 fueron alcanzados entre 6 y 8 horas después de la aplicación del esperma en los huevos. Para analizar cualitativamente, es decir la calidad de la fertilización se determinó dos indicativos: 1) porcentaje de embriones que llegaron a néurula (correspondientes a estadios larvales 26 -28 de *X. laevis*) y 2) y el porcentaje de embriones

que alcanzaron los estadios larvarios correspondientes a 44-48 de *X. laevis*, larvas de vida libre (Browne *et al.*, 2006).

4.6. CUIDADO DE EMBRIONES Y LARVAS DE *Rhinella marina*

Los renacuajos fueron adecuados en 4 acuarios medianos de 22,5 x 13,5 x 13 cm. de largo, ancho y profundidad respectivamente. Cada acuario se llenó una tercera parte con agua en donde se colocó un oxigenador marca JAD D-200. Al cabo de 48 horas se trasladó los renacuajos a un acuario oxigenado más grande (30 x 18,5 x 16 cm). Cuando los renacuajos a más de poseer patas traseras ya contaban con las delanteras, se procedió a reducir la cantidad de agua y colocar algún sustrato para que se posasen. Se alimentó a los renacuajos con balanceado para peces en primera instancia y a continuación con algas maceradas producidas en la Escuela de Bioanálisis de la PUCE. Se las maceró dejándolas en polvo. El alimento fue esparcido en toda la superficie del acuario tres veces por semana. La cantidad fue no más de la mitad de la superficie del terrario. También se les dio comida para peces marca TetraFin macerada. La limpieza se realizó tres veces a la semana antes de alimentarlos. Con un cernidor pequeño y con cuidado se trasladó a todos los renacuajos a otro terrario, se lavó el terrario eliminando los restos de comida, desechos y cadáveres de otros renacuajos. Posteriormente a la limpieza total del terrario cada uno fue llenado con agua reposada y vuelto a su lugar el oxigenador. Con el terrario listo y limpio se regresó a los renacuajos.

4.7. FIJACIÓN DE TEJIDOS DE *Rhinella marina* Y *Chiasmocleis bassleri*

Huevos y ovarios de *Rhinella marina* y ovarios de *Chiasmocleis bassleri* fueron fijados en una solución de Smith´s (4.3.2). Se los guardó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 24 horas. Luego fueron sometidos a tres lavados con agua destilada cada

treinta minutos para finalmente guardarlos en formaldehido al 1,5 % a – 4 °C. También fueron fijados en MEMFA (4.3.3) durante 20 minutos, después se retiró las membranas de protección en los embriones y se los guardó en etanol al 70 % a - 20°C.

La morfología externa de los embriones de *Rhinella marina* se documentó gracias a un estereoscopio Stemi SV11 ZEISS y una cámara digital Canon PowerShot G9. Las placas de huevos y ovario de *R. marina* y placas de huevos de *Chiasmocleis bassleri* fueron registradas por medio de micrografías. Se empleó un estereomicroscopio marca Zeiss, modelo Discovery V8 y con el microscopio marca Zeiss modelo Imager A2 y se descargaron con el software Axiovision del Laboratorio de Genética de la Dra. Violeta Rafael.

Para el reconocimiento de los diferentes estadios embrionarios de *Rhinella marina* se usó la tabla normal del desarrollo de *X. laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994) y la tabla normal de desarrollo de Gosner (Anexo 2). Se elaboró una tabla en la que se detalla la coincidencia de los estadios (Tabla 4).

4.8. OVULACIÓN EN *Chiasmocleis bassleri*

En julio del 2011, se ensayó la metodología ovulatoria usada en *Rhinella marina* en dos hembras de *Chiasmocleis bassleri.* Se usó una glándula pituitaria de *R. marina* usando dos dosis hormonales: una preovulatoria (10 % de la glándula pituitaria) de 36 horas y una dosis ovulatoria (90 % de la glándula pituitaria) de 12 horas. En el año 2012 se realizó un segundo ensayo, se modificó el protocolo anterior, y se inyectó una sola dosis ovulatoria (100 % de la glándula pituitaria de *R. marina*). En un tercer ensayo se usó una concentración del 12 % se esperó 24 horas. En un cuarto ensayo se usaron hembras de *C. bassleri*. Se procedió a aumentar la dosis a 15 % de una glándula pituitaria de *R. marina* y se esperó entre 16 y 22 horas (Tabla 5). Para cada inducción se utilizó pituitarias de *R.*

marina hembras sin un numero de colección para el Museo de Anfibios de la PUCE. Los ensayos se realizaron tanto con pituitarias como con hembras inducidas a ovulación colectadas en el mismo mes de inducción, mayo de 2012, con una LRC (longitud rostro cloacal) de entre 12 – 13 cm.

5. RESULTADOS

5.1. INDUCCIÓN A LA OVULACIÓN EN *Rhinella marina*

Los ensayos de inducción a la ovulación se realizaron empleando dos dosis hormonales, una preovulatoria más una ovulatoria. Se esperó 12 horas antes de extraer los huevos para su posterior fertilización. Las hembras donadoras de pituitaria estuvieron dentro del rango de 13-15 cm LRC y las hembras inducidas de 15-16 cm LRC.

Con respecto a los tiempos de dosis preovulatorias. Se ensayó en abril del 2010 en forma "piloto" cuatro diferentes posibles horas 24, 36, 48, 60 adecuadas para iniciar la maduración final de los oocitos. Se indujo la ovulación a un primer grupo de 4 hembras adultas con pituitarias de 4 machos de entre 12-13 cm LRC. Los resultados fueron nulos, en ningún tratamiento se produjo ovulación. Se indujo un segundo grupo con pituitarias de 4 hembras. En este segundo también se emplearon las 4 diferentes horas preovulatorias. Con una dosis preovulatoria de 24 horas no hubo ovulación. Con una dosis preovulatoria de 36 horas se observó que casi todos los oocitos de estadio 6 del ovario ingresaron al oviducto. El oviducto se localizó en casi toda la cavidad abdominal de la rana. En la sección histológica blanquecina del ovario se observó en su mayoría oocitos previtelogénicos de estadios I (Figura 10, B). Así como a simple vista del ovario, se observa que en su mayoría tiene oocitos de color blanquecino. Los huevos extraídos del ovisaco presentaron dos coloraciones bien definida una de otra, blanco y negro. Oscura para el polo animal y clara para el vegetal. En total se encontró aproximadamente 8000 huevos en ambos ovisacos. La dosis preovulatoria de 48 horas mostró un cuadro similar al de 36 horas con la diferencia de que en los huevos encontrados en el ovisaco no se distinguía del todo la coloración definidas entre el polo animal y vegetal, negro - blanco. En su lugar estos huevos se veían "licuados", y algunos tomaron una coloración café claro. Se encontró de 8000-10000 huevos. Finalmente para las 60 horas de espera de la dosis

preovulatoria se encontró con un cuadro similar al probado con un tiempo de 48 horas, huevos en el ovisaco licuados y la mayor parte de huevos se tornaron de color café. En agosto del 2011 se retomó el ensayo de 36 horas de dosis preovulatoria y los resultados fueron similares al anterior (Tabla 2). La prueba de estadístico Chi cuadrado aplicada para buscar diferencias entre cada tratamiento (horas de dosis preovulatoria) basándose en la variable de respuesta: huevos viables para asegurar éxito en la fertilización *in vitro*. El Chi cuadrado aplicado para 36 y 48 horas de dosis preovulatorias arrojó una significación de 0.000, valor altamente significativo (Figura 9, Tabla 8).

5.2. INDUCCIÓN A LA OVULACIÓN CON 36 HORAS DE TRATAMIENTO PREOVULATORIO EN *Rhinella marina*

En octubre del 2010, se indujo a ovulación a cinco hembras de *Rhinella marina* colectadas en septiembre de 2009, resultando cuatro ensayos exitosos. De los ensayos de inducción a la ovulación realizados en octubre, noviembre del 2011 y enero del 2012 con ranas colectadas en el mes de octubre del 2011, cinco de siete sapos resultaron negativas al tratamiento, no se encontró huevos. De los ensayos positivos, una hembra fue inducida con dos pituitarias y ovuló alrededor de 100 huevos en veinticuatro horas (doce horas antes de la dosis ovulatoria y veinticuatro después de la dosis preovulatoria) pero de igual forma que en todos los ensayos se le administró la dosis ovulatoria. Finalmente uno de los ensayos realizados en febrero del 2012 resultó positivo mientras el segundo en el cual se empleó dos pituitarias de machos expuestos cuatro meses a LHRH fue negativo (Tabla 3 y 6)

En el resto de ovario encontrado en las siete hembras inducidas con éxito, se observó oocitos de diferentes estadios vitelogénicos (estadios 4 y 5) diferenciados por su gran tamaño respecto al resto más una coloración oscura (Figura 10, A). También y en su

mayoría se observó oocitos previtelogénicos de color blancos opacos y transparentes estadio I (Figura 10, B) estos fueron reconocidos por su comparación con la tabla de oogénesis de *R. marina* (Anexo 3) descrita por Brown (Brown *el al.,* 2002).

5.3. FERTILIZACIÓN *in vitro* EN *Rhinella marina*

El número de huevos encontrados en el ovisaco, removidos al cabo de 12 horas después de la inyección de la dosis ovulatoria, fue de 10.351,4 ($\bar{x}$ + σ de 7 muestras) en las siete hembras inducidas. Los huevos extraídos de seis de las hembras (cuatro inducidas en octubre del 2010 con pituitarias colectadas en el 2009 y dos inducidas en enero y febrero del 2012 con pituitarias de hembra colectadas en octubre del 2011 y febrero del 2012), presentaban una coloración oscura para el polo animal y blanquecina para el polo vegetal además de estar recubiertos por membranas de protección como la membrana vitelina y capas de gelatina (Figura 11, A). Mientras los huevos encontrados en la hembra QCAZ-A 52307 inducida en enero del 2012 con 2 pituitarias de hembras colectadas en octubre del 2011 mostraron una coloración café además de no diferenciarse el color de ambos polos mostrando una apariencia difusa entre ellos (Figura 11, B).

Fertilizaciones realizadas en huevos de obtenidos de las 6 hembras inducidas con una sola glándula pituitaria presentaron las siguientes características: Después de aproximadamente cuatro horas el 90 % de los huevos fertilizados entraron en clivaje (9000 de 10000), a las cinco horas se encontraron en estadio 4 y 5. El porcentaje de neurulación estadios 26-28 comparados con la tabla normal de *Xenopus laevis* (Nieuwkoop y Faber) fue de 70 % (6300 de 9000). Los estadios fueron comparados con la tabla normal del desarrollo de *Xenopus laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994). El porcentaje de embriones en estadio 45 fue de 60 % (3780 de 6300) y con menos del 1 % de malformaciones (Tabla 7).

5.4. INDUCCIÓN A LA OVULACIÓN EN *Chiasmocleis bassleri*

Al emplear la metodología para inducción a la ovulación de *Rhinella marina*, en *Chiasmocleis bassleri* se obtuvo resultados positivos. Esta metodología fue la inducción con dos dosis, una preovulatoria del 10 % y una ovulatoria del 90 %. En los dos primeros ensayos en que se utilizó el protocolo de inducción a la ovulación de *R. marina*. Se obtuvo 70 y 200 huevos respectivamente de una coloración café difusa, es decir que no se diferenciaba el polo animal del vegetal. (Figura 12, A). Al reducir la dosis a una sola de 12 % y esperar la mitad del tiempo, 24 horas, se obtuvo de igual forma huevos. Los huevos fueron ~60, se diferenciaban los polos, animal del vegetal, oscuro, debido a la acumulación de pigmentos, para el polo animal y claro para el vegetal. (Figura 12, B). Con 15 % de la glándula y en un rango de 16 -22 horas en quince ensayos. Se observó huevos en el ovisaco con una coloración definida entre el polo animal y vegetal. La cantidad máxima de huevos encontrados fue de 250 y la mínima 80 (Tabla 5).

Los cortes histológicos de huevos de *C. bassleri* mostraron que los gránulos de pigmento se hallaban restringidos hacia el córtex del polo animal. Con un tamaño aproximado de 900 micras (figura 13, A). A diferencia del huevo de *R. marina* en el cual los gránulos de pigmento se encuentran dispersos en todo el polo anima (Figura 13, B)

5.5. MORFOLOGÍA PARCIAL EXTERNA DE LOS ESTADIOS DEL DESARROLLO TEMPRANO DE *Rhinella marina.*

Para describir los diferentes estadios del desarrollo temprano de *Rhinella marina*, se los comparó con los estadios de la tabla normal del desarrollo de *Xenopus laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994), la tabla normal del desarrollo de Gosner (1960), y la tabla normal del desarrollo de *Bufo valliceps* (Limbaugh y Volpe, 1952) (Tabla 4). Se notó que

los embriones de *R. marina* se desarrollan más lentamente que los tiempos propuestos en la tabla normal del desarrollo de *X. laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994). Por ejemplo los embriones de *R. marina* tarda aproximadamente 1 día en llegar a gástrula. Mientras en *X. laevis* tarda alrededor de nueve horas y trece horas en *Bufo valliceps*.. Este lento tiempo en el desarrollo con respecto a *X. laevis* y *Bufo valliceps* se mantuvo durante todo el desarrollo (Anexo 1 y 4). Los huevos de *R. marina* obtenidos a partir de inducciones hormonales fueron fertilizados el 12 de febrero del 2012 a las 11:30 de la mañana. El tamaño promedio de los huevos de *R. marina* (50 % contados) fue de 1.5 mm.

Estadio 1. Luego de la fertilización, el embrión experimentó una rotación por acción de la gravedad, situándose el polo animal hacia arriba y el polo vegetal hacia abajo. (Figura 14, A; Tabla 4).

Estadio 2. Aparece la media luna gris, el primer clivaje tuvo lugar luego de 1 hora: 40 minutos, originando 2 blastómeras (Figura 14, B; Tabla 4).

Estadio 3. Después de 2 horas: 15 minutos se da el segundo clivaje y se forman 4 blastómeras (Figura 14, C; Tabla 4).

Estadio 4. El tercer clivaje tiene lugar habiendo transcurrido 2 horas: 25 minutos, con 8 células formadas (Figura 14, D y D´;Tabla 4).

Estadio 5. Cuarto clivaje luego de 10 minutos, con 16 blastómeras (Figura 14, E y E´; Tabla 4).

Estadio 6. Transcurridas 4 horas: 45 minutos, el quinto clivaje se presenta, formándose 32 blastómeras. El embrión aparece rodeado de membrana vitelina. (Figura 14, F; Tabla 4).

Estadio 7. Durante esta etapa ya son evidentes más de 32 blastómeras, luego de haber pasado 5 horas aproximadamente (Figura 14, G; Tabla 4).

Estadios 8-9. Después de 25 minutos más, inicia la blástula, con más de 64 blastómeras formadas (Figura 14, H; Tabla 4). Al alcanzar el estadio 9, el embrión se encuentra ya en blástula media.

Estadio 10. Inicia la gástrula, todo el embrión presentó bordes irregulares y apareció el labio dorsal del blastoporo. Para llegar a este estadio transcurrieron 6 horas (Figura 14, I e I´; Tabla 4).

Estadio 11. El embrión se encontró en gástrula temprana, después de 24 horas y 11 minutos. Se visualizó pequeñas células (micrómeras) en el polo animal y se observó por primera vez el tapón de yema. (Figura 14, J; Tabla 4).

Estadios 12 – 12,50. Durante esta fase el embrión entró en gástrula media, incrementándose su tamaño a 1,75 mm y reduciéndose significativamente el tapón de yema (Figura 14, K y L; Tabla 4). El tiempo transcurrido hasta esta etapa fue de 2 días: 2 horas.

Estadio 13. El tapón de yema se notó mínimo durante la gástrula tardía. Hacia el final del estadio 13,50 se observó claramente la desaparición del tapón de yema y el cierre del blastoporo (Figura 14, M y M´; Tabla 4).

Estadio 14. Habiendo transcurrido 3 días: 4 horas, comenzó la néurula. Se visualizó la placa neural en forma plana, los pliegues neurales y tubo neural abiertos. Los embriones aumentaron de tamaño a 2 mm (Figura 14, N; Tabla 4).

Estadio 15. Los pliegues neurales se mostraron más unidos, el tubo neural continuó abierto (Figura 14, O; Tabla 4).

Estadio 16. 4 días más tarde comenzó a evidenciarse la unión de los pliegues neurales entre sí. (Figura 14, P; Tabla 4)

Estadio 17. Los pliegues neurales comenzaron a fusionarse para dar lugar al tubo neural, el tamaño del embrión aumentó a 2,25 mm. Hasta este estadio el embrión permaneció en la fase conocida como néurula media (Figura 14, Q; Tabla 4).

Estadio 18. Tuvo lugar la etapa final de la néurula (néurula tardía). La fusión de los pliegues neurales fue evidente, aparecieron abultamientos laterales correspondientes a las futuras branquias, derivadas del segundo y tercer arco branquial (Duellman y Trueb, 1994) (Figura 14, R; Tabla 4).

Estadio 19 – 19,50. Comenzó el desarrollo del cuerpo de la cola en los embriones, llegando a medir 2,76 mm. Se formó la glándula de cemento, ocupando un 50 % de la parte ventral - caudal de la cabeza (Figura14, S y S´; Tabla 4). Algunos embriones presentaron ausencia total o parcial de membrana vitelina. A partir de esta etapa se dieron los primeros nacimientos.

Estadio 20. Los embriones crecieron hasta 4,50 mm, las contracciones musculares fueron visibles y se diferenció estructuras como los arcos branquiales y las fosas nasales (Figura 14, T y T´; Tabla 4).

Estadio 21. Las branquias se externalizaron y ramificaron. El corazón inició su actividad presentando los primeros latidos. (Figura 14, U y U´; Tabla 4)

Estadio 22. Se transparentó la córnea, la abertura bucal fue evidente y la cola se elongó. La glándula de cemento comenzó a desaparecer (Figura 14, V y V´; Tabla 4).

Estadio 23. Las larvas alcanzaron los 6mm, el ala de la cola se amplió y comenzó la circulación en la misma. El ojo comenzó a desarrollarse (Figura 14, W; Tabla 4).

Estadio 24. Después de 14 días: 14 horas desde la fertilización, apareció una estructura llamada opérculo. La boca se desarrolló, diferenciándose los dentículos y se alargaron las branquias (Figura 14, X; Tabla 4).

Estadio 25. El opérculo empezó a cerrarse desde la derecha hacia la izquierda, recubriendo y encerrando a las branquias en dicho sentido. (Figura 14, Y; Tabla 4).

Estadio 26. Se formó el espiráculo hacia la parte final en la región caudal izquierda del cuerpo del embrión. Las piezas bucales se mostraron completamente desarrolladas (Figura 14, Z; Tabla 4).

Entre los Estadios 27 y 41 se desarrollaron las patas y finalmente se observó emerger al primer metamorfo en el Estadio 46, habiendo transcurrido 89 días desde la fertilización (Tabla 4).

5.5.1. DESCRIPCIÓN DE LA LARVA DE *Rhinella marina*

El cuerpo del renacuajo mide 1,5 mm y sumado la longitud de la cola mide 6 mm. El cuerpo es ovoide en vista dorsal; el ancho máximo del cuerpo es 1,3 mm y lateralmente el hocico sobresaliente con el extremo romo. La posición de los ojos es dorsal y orientada lateralmente, la distancia interorbital es de 0,45 mm. En cuanto a las narinas externas su posición es dorsal, ubicadas a un tercio de la distancia de los ojos al hocico (Figura 15, A) Espiráculo siniestral y lateral, abertura del espiráculo orientado posterodorsalmente. Tubo ventral medial. Altura máxima de la cola 1,25 mm y ubicada aproximadamente en la mitad de su longitud, altura máxima de la cola muscular 0,5 mm, ancho máximo de cola muscular 0,3mm (Figura 15, B y D). El disco oral esta emarginado en posición ventral. Las papilas marginales presentes sólo lateralmente en el labio anterior y posterior. La envoltura mandibular dorsal y ventral es de similar tamaño, ambas con bordes ligeramente aserrados (Figura 15, C). La coloración en líquido persevante es transparente y no interfiere con el color oscuro del dorso del cuerpo, y el vientre es opaco tenue, y el intestino ligeramente se torna visible; la musculatura caudal es opaca con manchas grisáceas pequeñas, y la aleta es ligeramente translúcidas.

6. DISCUSIÓN

6.1. TIEMPOS DE DOSIS PREOVULATORIAS EN *Rhinella marina*

Con pituitarias de hembras se obtuvieron ovulaciones desde 36 a 60 horas, a pesar de que a 48 y 60 horas de la dosis ovulatoria también ovularon, éstos no fueron contados como resultados positivos debido a que la variable de éxito analizada en el ensayo fue el éxito de fertilización. Y las tasas de fertilización en estos dos tratamientos fueron mínimas. Los ensayos de 24 horas no provocaron que los oocitos maduren es decir salgan del ovario y se dirijan al oviducto esto podría deberse a que el tiempo de acción de la hormona no fue suficiente ya que por el contrario los ensayos de 36 horas en adelante si inducen la obtención de huevos. El estadístico Chi cuadrado mostró una significación de 0.000, la cual es menor que 0.05 por lo que se infirió que existen diferencias altamente significativas entre ellos, lo cual presume que el tratamiento más exitoso, tiempo de acción de la dosis preovulatoria fue el de 36 horas (Figura 9). Con 36 horas de dosis preovulatoria se consiguió éxito en la fertilización alcanzando un estadio 45 aproximadamente el 60 % de embriones versus aproximadamente 17 % en 48 horas.

Experimentos usando pituitarias de sapos hembra y macho han sido reportados desde hace varios años, en los cuales se determina que la pituitaria de las hembras mantiene una mayor concentración hormonal que la de los machos (Rugh, 1934b). Una razón de los resultados negativos obtenidos podría atribuirse a este hecho. Las pituitarias utilizadas en los primeros cuatro ensayos de la tabla 2 fueron de machos. También se ha determinado que las concentraciones se emparejarían en una proporción 2:1, dos pituitarias de macho son equivalentes a una de hembra (Rugh, 1934b). Ésta sería la explicación por la cual en estos ensayos no se registraron ovulaciones. En cuanto a los siguientes ensayos de 24 horas y usando pituitarias de hembras no se obtuvieron ovulación posiblemente al corto

tiempo de dosis preovulatoria. A pesar de que estudios previos en los que se habla de que las dosis preovulatorias funcionan en un rango de 24 a 96 horas (Kouba *et al.*, 2009), en nuestros ensayos se observó que a veinticuatro horas no se logra obtener huevos.

Cave recalcar, que a fin de mantener el control sobre el tiempo de las dosis hormonales se abrieron a las hembras después de doce horas de la dosis ovulatoria. Es decir a las treinta y seis, cuarenta y ocho, sesenta y setenta y dos horas. Además de obtener la totalidad de los huevos de los ovisacos.

6.2. FERTILIZACIÓN *in vitro* EN *Rhinella marina*

La fertilización comprende la fusión de ambos gametos para formar un nuevo individuo con un genoma 2n (Gilbert, 2005). En el caso de *Rhinella marina* la fertilización fue realizada manualmente, liberando el esperma de los testículos sobre los huevos. Para maximizar la fertilización es importante separar minuciosamente una de otra las hileras de huevos, así el esperma fecunda exitosamente. Las fertilizaciones exitosas se dieron con los huevos de las ranas que siguieron el protocolo propuesto en esta investigación, una primera dosis preovulatoria de 36 horas y una dosis final ovulatoria de 12 horas antes de abrir a la rana. Mientras aquellas en las cuales no se concluyó el protocolo, es decir, ovularon antes de lo previsto por uno u otro factor, presentaron una tasa de mortalidad elevada (5200 de 6300 embriones). Esto se debe a que los huevos pasaron demasiado tiempo, el cual desconocemos, en el ovisaco, entrando en un proceso degenerativo. Esto se pudo observar en la textura de los huevos encontrados, se presentaron licuados y adoptaron una coloración café-marrón. Al cabo de aproximadamente cinco horas después de fertilizados, estos huevos degeneraron casi en su totalidad (Figura 16); no existió clivaje ni desarrollo posterior. Este fracaso en la fertilización se debe a que la calidad de los huevos no fue óptima y por ende no fertilizaron en su mayoría y los que lo hicieron, no sobrevivieron más

allá de las primeras divisiones embrionarias. Otro factor imperativo en el éxito de fertilización es el tiempo que permanezcan los huevos en seco antes de fertilizar y cubrir con agua. Los huevos que tardaron alrededor de 10 minutos en fertilizar presentaron una tasa de no fertilización alta 75 % de la caja petri, esto se debe a que al pasar tanto tiempo expuestos al aire se deshidrataron y se sabe que existe una quimio-atracción desde el gameto femenino hacia el masculino, por medio de la secreción de moléculas solubles que atraen al espermatozoide hacia el huevo por otro lado el espermatozoide secreta enzimas que le permiten atravesar las membranas de protección del huevo (Wolpert *et al.*, 2007). Una vez que se produce una unión exitosa, las superficies externas del espermatozoide y el óvulo se adhieren antes de fusionarse, es allí cuando el espermatozoide emite su ADN al interior, fecundando el óvulo (Wolpert *et al.*, 2007; Puente, 2005). Por lo tanto la fertilización pudo no haberse realizado debido a que la capa gelatinosa se deshidrató y el huevo no pudo ser reconocido por el esperma o no tuvo el medio para nadar hacia el huevo.

Después de la fertilización se observó el polo animal pigmentado hacia arriba y el polo vegetal claro hacia abajo debido a que el embrión se encuentra en el líquido previtelínico en el cual es libre de rodar por efecto de la gravedad (Gilbert, 2005). La capa gelatinosa se hidrata al máximo proporcionando protección al huevo (Puente, 2005). En cuanto al desarrollo embrionario, los cigotos experimentaron una serie de transformaciones llamadas clivaje, gastrulación y neurulación para después adquirir la forma característica de la larva y finalmente la de un renacuajo (Gilbert, 2005). Todo este proceso fue documentado fotográficamente, además se fijaron para cualquier ensayo posterior.

6.3. MORFOLOGÍA PARCIAL EXTERNA DE LOS ESTADIOS DEL DESARROLLO TEMPRANO DE *Rhinella marina.*

Los estadios fueron comparados con la tabla normal del desarrollo de *X. laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994) junto con la tabla de desarrollo de Gosner (1960) y el desarrollo temprano de *Bufo valliceps* (Limbaugh y Volpe, 1952) (Tabla 4).

Rhinella marina tiene una distribución de yema mesolecítica de clivaje holoblástico, al producirse el primer clivaje, el córtex animal se torna arrugado, los pigmentos se agrupan en pequeños parches y algunos de ellos comienzan a movilizarse al interior del huevo, formando dos blastómeras, este proceso se da durante el estadio 2. El estadio 3 transcurre con el segundo clivaje, se da una división perpendicular a la primera, resultando 4 células. En el estadio 4 se produce una división ecuatorial, luego de la cual se forman en 8 blastómeras, observándose, como en *X. laevis*, la diferencia de tamaño entre las 4 blastómeras del polo animal, pequeñas, en relación a las del polo vegetal notablemente más grandes. Esto debido a que el polo vegetal contiene mayor vitelo y tarda más tiempo en completar el clivaje. Durante el cuarto clivaje, en estadio 5 resultan 16 blastómeras, subsecuentemente en el estadio 6 y 7 continúan las divisiones, dando paso a un embrión con más de 32 blastómeras. La blástula, reconocida por presentar más de 64 blastómeras, inicia partir de los estadios 8 y 9, sin que el embrión tenga un aumento en su tamaño. Al iniciar la gástrula, durante el estadio 10, hacia la zona marginal, aparece una hendidura en forma de media luna, denominada labio dorsal del blastoporo. El labio del blastoporo constituye el inicio del arquénteron. En estadio 10,5 gástrula temprana se visualiza un círculo de células, llamado tapón de yema. Al pasar a los estadios 11 y 12, continuó la invaginación de las células ectodermales con el alargamiento del labio del blastoporo, el tapón de yema se va reduciendo conforme pasa el tiempo y se forman las capas germinales. Para el estadio 13, gástrula tardía, el labio dorsal se desarrolló por las zonas laterales (labio

lateral) hasta llegar a la parte vegetal donde son alcanzados por el labio ventral. Los macrómeros que quedaron entre los labios forman un tapón de yema bastante reducido. En el estadio 13, el tapón de yema es mínimo (Hausen *et al*., 1991). En especies como *Colosthetus machalilla*, el tapón de yema ha sido ya reabsorbido y el blastoporo se ha cerrado para esta etapa (del Pino *et al*, 2004). Al inicio del estadio 14 es visible la placa neural a causa del engrosamiento del ectodermo neural. Durante el estadio 15 continúa la neurulación y son más visibles los que serían los pliegues neurales, elevaciones engrosadas del ectodermo a derecha e izquierda de la placa neural. La elevación de pliegues neurales origina la formación de un surco neural en la parte media de la placa neural. Continúa el acercamiento de los pliegues neurales dejando a la vista el tubo neural abierto. Los embriones en estadio 17 aumentaron su tamaño a 2,25 mm, comenzaron a fusionarse los pliegues neurales, cerrando el tubo neural. En el estadio 18 se notó abultamientos laterales pertenecientes a las futuras branquias. Además de notarse las ramas branquiales (Sáenz, 2008). Los estadios subsiguientes al 18 pertenecen al desarrollo del cuerpo de la cola según el Atlas de Histología de *Xenopus laevis* (Hausen y Riebesel, 1991). En el estadio 19 se vio la formación de la glándula de cemento al final del estadio, esta glándula de adherencia ocupaba un 50 % de la parte ventral caudal de la cabeza. En anuros del género *Engystomops* esta glándula es visible desde el estadio 18 (Romero *et al*, 2009), contrastando con los embriones de *C. machalilla*, que no llegan a manifestar esta estructura durante su desarrollo temprano (del Pino *et al*, 2004). Los embriones de *Rhinella marina* nacen al final del estadio 19, siendo estos nacimientos tempranos una característica de los bufónidos (Limbaugh y Volpe, 1957); especies como *Bufo valliceps* y *B. arenarum*, presentan nacimientos durante etapas más tempranas aún, como los estadios 16 y 17 (Conte y Sirlin, 1952; Limbaugh y Volpe, 1957). Durante el estadio 20 los embriones aumentaron su tamaño hasta 4,50 mm se divisó unos abultamientos laterales en la cabeza

correspondientes a las branquias y el corazón empezó a latir. En el estadio 21 la glándula de cemento empieza desaparecer y la cabeza toma una forma redondeada, se ramificaron las branquias y comenzó la circulación en ellas. En el estadio 22 el embrión se alargó, se evidenció la apertura de la boca, la córnea se transparentó y la glándula de cemento desapareció. Estadio 23 se alargó la cola y comenzó la circulación en ella. Estadio 24 aparece el opérculo. El cual en el estadio 25 habrá de encerrar las branquias desde su base; esta etapa del desarrollo temprano coincide en gran medida con lo evidenciado en *B. valliceps* (Limbaugh y Volpe, 1957), que también culmina esta fase con la absorción de las branquias y desaparición del opérculo. Durante el estadio 26 aparece el espiráculo en la larva, además termina el desarrollo del aparato bucal.

En el estadio 19 un 80 % de las larvas eclosionan, cabe recalcar que el estadio 19 de *Rhinella marina* en esta investigación, corresponde al estadio 26 de *Xenopus laevis* (Nieuukoop y Faber, 1994). Entonces las larvas de vida libre nacientes no tenían claramente diferenciado la cabeza del tronco, no había rastro de la formación de ninguna estructura salvo la glándula de cemento. A diferencia del estadio 26 correspondiente a *X. laevis* en el cual se observa notablemente la glándula de cemento el esbozo de la boca y el inicio de la externalización de las branquias. En el estadio 26 correspondiente al estadio 46 de *X. laevis*, las vainas mandibulares presentaron los bordes aserrados una inferior con forma de V y la superior en forma de arco sobrepuesta a la inferior así como la primera y segunda hilera de dientes anterior y posterior más las papilas marginales. Se pudo observar los restos de la glándula de cemento y el cierre del opérculo ha concluido con la formación del espiráculo en el lado izquierdo del cuerpo (Zaracho *et al*., 2003).

6.4.INDUCCIÓN A LA OVULACIÓN EN *Chiasmocleis bassleri*

De los ensayos de inducción a la ovulación en *Chiasmocleis bassleri* usando el protocolo de inducción en *Rhinella marina*, se obtuvo una media de 135 huevos de los cuales no mostraron buena coloración al igual que los huevos de *R. marina.* Ésta coloración difusa a causa de la degradación del huevo podría al igual que en *R. marina* provocar una fertilización poco exitosa. Por esta razón se redujo a una sola dosis y a la mitad del tiempo, se obtuvo huevos con coloración definida, por lo cual se podría inferir que para inducir a la ovulación a *C. bassleri* no se requiere de dos dosis hormonales, sino más bien que con una sola dosis se obtiene un resultado positivo. De tal forma que al aumentar la dosis a 15 % y en un lapso de 16 a 22 horas de acción en nueve ensayos. Mediante la información acerca de inducciones a la ovulación y fertilizaciones *in vitro* con pituitarias de distinta especie que la hembra inducida (Rugh, 1934b) se probó que la pituitaria de *R. marina* induce exitosamente a la ovulación a *C. bassleri*. Los resultados positivos en todos los ensayos realizados podrían ser explicados por el gran tamaño de la hembra donadora de pituitaria con respecto a la hembra inducida, la diferencia tamaño puede influir en el éxito de la inducción, tal como sucedió con las *R. marina* (Figura16).

Al comparar histológicamente los huevos de *R. marina* versus los huevos de *C. bassleri* pudimos notar una diferencia en cuanto a la posición de los gránulos de pigmento, dentro del polo animal. Así en *R. marina* se vio que los gránulos están distribuidos en todo el polo animal. Mientras que en *C. bassleri* estos gránulos se encontraron restringidos hacia el córtex del polo animal (Figura 13, A y B).

7. CONCLUSIONES

1. La maduración de los oocitos de *Chiasmocleis bassleri*, mediante el empleo de soluciones hormonales a partir de macerados de pituitaria extraída de *Rhinella marina*, fue posible.
2. La estimulación hormonal mediante disoluciones de pituitaria en la inducción a la ovulación en *Rhinella marina* es eficiente.
3. El protocolo se basa en la administración de una primera dosis hormonal, la cual es una señal baja con una concentración del 10 % de la glándula. Dicha señal llamada dosis preovulatoria actúa por 36 horas y es seguida por una dosis ovulatoria del 100 % de concentración hormonal (glándula).
4. La fertilización en seco de *Rhinella marina* fue exitosa. Mediante comparaciones morfológicas con las tablas de desarrollo de Nieuwkoop y Faber, 1994 y la de Gosner, 1960. Se describió la morfología externa de embriones y larvas.

8. LITERATURA CITADA

Aguilar, R. F., Hernandez-Divers, S. M. y Hernandez-Divers, S. J. 2005. Atlas de Medicina, Terapéutica y Patología de Animales Exóticos (Atlas of Medicine, Therapy and Pathology of Exotic Animals). Editorial Inter-Medica, Buenos Aires, Argentina.

Ashton, R. E. y Ashton, P.S. 1988. Handbook of Reptiles and Amphibians of Florida. Part Three, the Amphibians. Windward Publishing: 191.

Brown, F. D. K., del Pino, M. E., Krohne, G. 2002. Bidder´s organ of the toad *Bufo marinus*: Effects of orchidectomy on the morphology and expression of lamita – associated polypeptide 2. Development, Growth and Differentiation 44:527-535.

Browne, R. K., Clolow, J., Mahony, M. y Clark, A. 1998. Successful Recovery of Motility and Fertility of Cryopreserved Cane Toad (*Bufo marinus*) Sperm. Cryobiology 37: 339–345.

Browne, R. K., Clolow, J. y Mahony, M. 2001. Short-term storage of cane toad (*Bufo marinus*) gametes. Reproduction 121: 167–173.

Browne, R. K. y Figiel, C. R. 2008. Hormone preparation and use. Disponible en: <https://aark.portal.isis.org/researchguide/reproduction%20technology/hormone%20preparation%20and%20use.pdf> [Consultado: Abril del 2010].

Browne, R. K., Li, H., Seratt, J. y Kouba, A. J. 2006. Progesterone improves the number and quality of hormone induced Fowler toad (*Bufo fowleri*) oocytes. Reproductive Biology and Endocrinology 4:34.

Browne, R. K., Seratt, J., Vance, C. y Kouba, A. J. 2006. Hormonal priming, induction of ovulation and *in-vitro* fertilization of the endangered Wyoming toad (*Bufo baxteri*). Reproductive Biology and Endocrinology 4: 34.

Browne, R. K. y Zippel, K. 2007. Reproduction and Larval Rearing Amphibians. ILAR Journal 48:34.

Byrne, P. G y Silla, A. J. 2010. Hormonal induction of gametes release, and *in vitro* fertilization, in the critically endangered Southern Corroboree Frog, *Pseudophryne corroboree.* Reproductive Biology and Endocrinology 4:114.

Castillo, J.A. y Arteaga-Navarro, A.F. 2011. *Rhinella marina*. En *The Amphibians and Reptiles of Mindo*. Version 2011.a., eds Arteaga-Navarro AF, Bustamante-Enríquez LM, Guayasamin JM and Castillo JA. Disponible en: <http: //www.tropicalherping.com/articles/inventories/mindo/main.html> [Consultado: Noviembre del 2011].

Clarke, M. y Thomas, J. 2005. *Cane Toad Management in the Lower Clarence Valley, NSW*. Department of Environment and Conservation, Parks and Wildlife Division, North Coast Region.

Coloma, L. 2006. Iniciativa Balsa de los Sapos. Implementando un plan estratégico para la conservación de los anfibios ecuatorianos en riesgo de extinción. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Escuela de Ciencias Biológicas. Museo de Zoología QCAZ.

Conte, E.J y Sirlin, L. 1952. Pattern Series of the First Embryonary Stages in *Bufo arenarum*. Anat. rec., vol. 112, pp. 125-135.

Crespo, C., Ramos, I., Medina, M. y Fernández, S. 2009. Analysis of *Bufo arenarum* oviductal secretion during the sexual cycle. Zigote 17: 329 - 340

del Pino, E. M., Ávila, M. E., Pérez, O. D., Benítez, M. S., Alarcón, I., Noboa, V. y Moya, I. M. 2004. Development of the dendrobatid frog *Colosthetus machalilla*. Int J Dev Biol 48:663–670.

Dennis – Smith, L., Ecker, R. E. y Subtelny, S. 1968.*In vitro* induction of physiological maturation in *Rana pipiens* oocytes removed from their ovarian follicles. Developmental Biology, Issue 6 (17): 627–643.

Duellman, W. E. 1978. The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador Miscellaneous Publications of the University of Kansas, Museum of Natural History 65: 1–352.

Duellman, W. E. y Trueb, L. 1986. Biology of amphibians. McGraw-Hill Publishing Company. Baltimore-USA

Duellman, W.E. y Trueb, L. 1994. Biology of Amphibians. The Johns University Press: 670 p.

Dumont, J. N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. Journal of Morphology 136(2):153-179.

Frost, D. R. 2011. Amphibian Species of the World. American Museum of Natural History, New York. Disponible en: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/> [Consultado: Diciembre del 2011].

Genomics. Energy.Gov. 2011. This site is a Gateway to the U. S. Department of Energy´s genomic websites. Disponible en: <http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/glossary/glossary_m.shtml> [Consultado: Diciembre del 2011].

Gilbert, S. F. 2005. Biología del Desarrollo. 7ª Edición. Editorial Médica, Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

González, C. J. 2001. Región Costa Manabí-Jama. Copyright © 2001 Correos del Ecuador. Disponible en: <http://www.visitaecuador.com/costa.php?opcion=datos&provincia14> [Consultado: Septiembre del 2011].

Hausen, P. y Riebesell, M. 1991. The Early Development of *Xenopus laevis*. An Atlas of the Histology. Springer- Verlag Heidelberg New York.

Hollinger, T. y Corton, G. 1980. Artificial fertilization of gametes from the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. Gamete Res 3:45–57.

Icochea, J., Azevedo-Ramos, C., Coloma, L. A. y Ron, S. 2004. *Chiasmocleis bassleri.* En IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1.Disponible en: http://www.iucnredlist.org [Consultado: Septiembre del 2011].

IUCN, Conservation International, y NatureServe. 2006. Global Amphibian Assesment. Disponible en: <http://www.globalamphibians.org> [Consultado: Julio del 2011].

IUCN 2011. IUCN Lista Roja de las Especies amenazadas. Version 2011.2. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org> [Consultado: Noviembre del 2011].

Kouba, A. J., Vance, C. K. y Willis, E. L. 2009. Artificial fertilization for amphibian conservation: Current knowledge and future consideration. Theriogenology 71: 214–227.

Kouba, A. J. y Vance, C. K. 2009. Applied reproductive technologies and genetic resource banking for amphibian conservation. Reproduction, Fertility and Development 21: 719-737.

Krakauer, T. 1968. The ecology of the neotropical toad, *Bufo marinus*, in south Florida. Herpetologica 24: 214–221.

Lajmanovich, R. C. 2000. Interpretación ecológica de una Comunidad Larvaria de Anfibios Anuros. Interciencia 25: 71-79.

Light, P. y Pickoff, H. 1976. Species specificity in the response of an *in vitro* amphibian (*Xenopus laevis*) ovulation assay to mammalian lutenizing hormones. Gen Comp Endocrinol 29:552-555.

Limbaugh, B. A. Volpe, E. P. 1957. Early Development of the Gulf Coast Toad, *Bufo valliceps* Wiegmann. American Museum Novitates. American Museum of Natural History. Nº 184. New York.

Lynch, J. D, y Rengifo J. M., 2001.- Guía de anfibios y reptiles de Bogotá y sus alrededores. Inpresol Ediciones. Bogotá.

Maldonado, D. 2010. El Matal Pueblo de Pescadores. Disponible en: <http://www.davidmaldonado.info/blog/jama/matal-playa-de-pescadores/> [Consultado: Diciembre del 2011].

Masui, Y. 1967. Relative roles of the pituitary, follicle cells, and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens.* Journal of Experimental Zoology 166: 365–375.

Menéndez-Guerrero, P. A. 2001. Ecología trófica de la comunidad de anuros del Parque Nacional Yasuní en la Amazonía Ecuatoriana. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Michael, S., Buckley, C., Toro, E., Estrada, A. y Vincent, S. 2004. Induced ovulation and egg deposition in the direct developing anuran *Eleutherodactylus coqui.* Reproductive Biology and Endocrinology 2:6.

Morrill, G. A., Schatz, F., Kostellow, A. y Bloch, E. 2006. Gonadotropin stimulation of steroid synthesis and metabolism in the *Rana pipiens* ovarian follicle: Sequential changes in endogenous steroids during ovulation, fertilization and cleavage stages. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 99: 129–138.

Nieuwkoop, P. D. y Faber, J. 1994. Normal Table of *Xenopus Laevis* (Daudin, 1956): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of Metamorphosis. Garland Publishing Inc., New York, USA.

Pérez-Coll, C. S. y Herkovits, J. 1996. Stage-Dependent Uptake of Cadmium by *Bufo arenarum* Embryos. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 56: 4.

Puente, A. F. 2005. Huevos y Larvas de Anfibios. Disponible en: <http://www.aranzadi-zientziak.org/fileadmin/docs/Munibe/1958325344.pdf> [Consultado: Marzo del 2012].

Rodríguez, L. O. y Duellman, W. E. 1994. Guide of the frogs of Iquitos Region Amazonian Perú. Museum Natural University of Kansas Special Publi., 22: ivi, t-80.

Romero - Carvajal, A., Lee, C., Bond, J., Sáenz – Ponce, N., Ryan, M. J., Venegas – Ferrín, M., Wallingford, J. B., Almeida – Reinoso, D. y del Pino, E. M. 2009. Embryogenesis and Laboratory Maintenance of the Foam-Nesting Túngara Frogs, Genus Engystomops (= Physalaemus). Developmental Dynamics. 238:1444–1454.

Ron S. R., Guayasamín J. M., y Menéndez-Guerrero P. A. 2011 AmphibiaWebEcuador. Version 2012.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Disponible en: <http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/AnfibiosEcuador/DiversidadEndemismo.aspx> [Consultado: Abril del 2012].

Rugh. R. 1934a. Pituitary-Induced Sexual Reactions in the Anura. *Biological Bulletin* 68: 74-81

Rugh. R. 1934b. Induced ovulation and artificial fertilization in the frog. *Biological Bulletin* 66: 22-29.

Sáenz, A. N. 2008. Neurulación en cinco especies de ranas (Engystomops, Dendrobates, Ameerega y Epipedobates). Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Savage, J. M. 2002. The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna between two Continents, between two Seas. University of Chicago Press. Chicago.

Schuetz, A.W. 1971. *In vitro* induction of ovulation and oocyte maturation in *Rana pipiens* ovarian follicles: effects of steroidal and nonsteroidal hormones. J ExpZool,

178:377-385.

Sigma-Aldrich. 2011. Progesterona Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/customer-service/about-us.html> [Consultado: Septiembre del 2011].

Sive, H., Grainger, R. y Harland, R. 2000. Early Development of *Xenopus laevis* a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

Solís, F., Ibáñez, R., Hammerson, G., Hedges, B., Diesmos, A., Matsui, M., Hero, J.M., Richards, S., Coloma, L.A., Ron, S., La Marca, E., Hardy, J., Powell, R., Bolaños, F., Chaves, G. y Ponce, P. 2008. *Rhinella marina* En IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org> [Consultado: Septiembre del 2011].

Subtelny, S., Dennis - Smith, L. y Ecker, R. E. 1968. Maturation of ovarian frog eggs without ovulation.Journal of Experimental Zoology Volume 168: 39–47.

Teisaire, E. S., Nieto, O. L., Roldán, I. A., Ulloa, Z., López, M. y García, A. 2010. Guía de trabajos prácticos de Embriología. Reduca (Biología). Serie Embriología 3: 1-13.

Trujillo-Hernández, J., Carballo-Hondal, O. y Saia-Guerra, Y. 2003. Reproducción asistida mediante el uso de hormonas en la rana cubana *Osteopilus septentrionalis*. (Anura: Hylidae). RETEL, Revista de Toxicología en línea.

Vargas, D. 2011. Crecimiento y maduración de oocitos biderianos en machos adultos de *Rhinella marina* mediante el uso de hormonas y disruptores endócrinos. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Whitaker, B. y Wright, K. 2001. Amphibian Medicine and Captive Husbandry. Krieger Publishing Company. Florida, USA.

Wolpert, L., Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E. y Smith, J. 2007. Principles of Development. 3 th Edition. Oxford, United States.

Zaracho, V., Céspedez, J. y Álvarez, B. 2003.Descripción de caracteres morfológicos en larvas prometamórficas de *Physalaemus biligonigerus* (anura, leptodactylidae). FACENA 19: 97-108.

9. FIGURAS

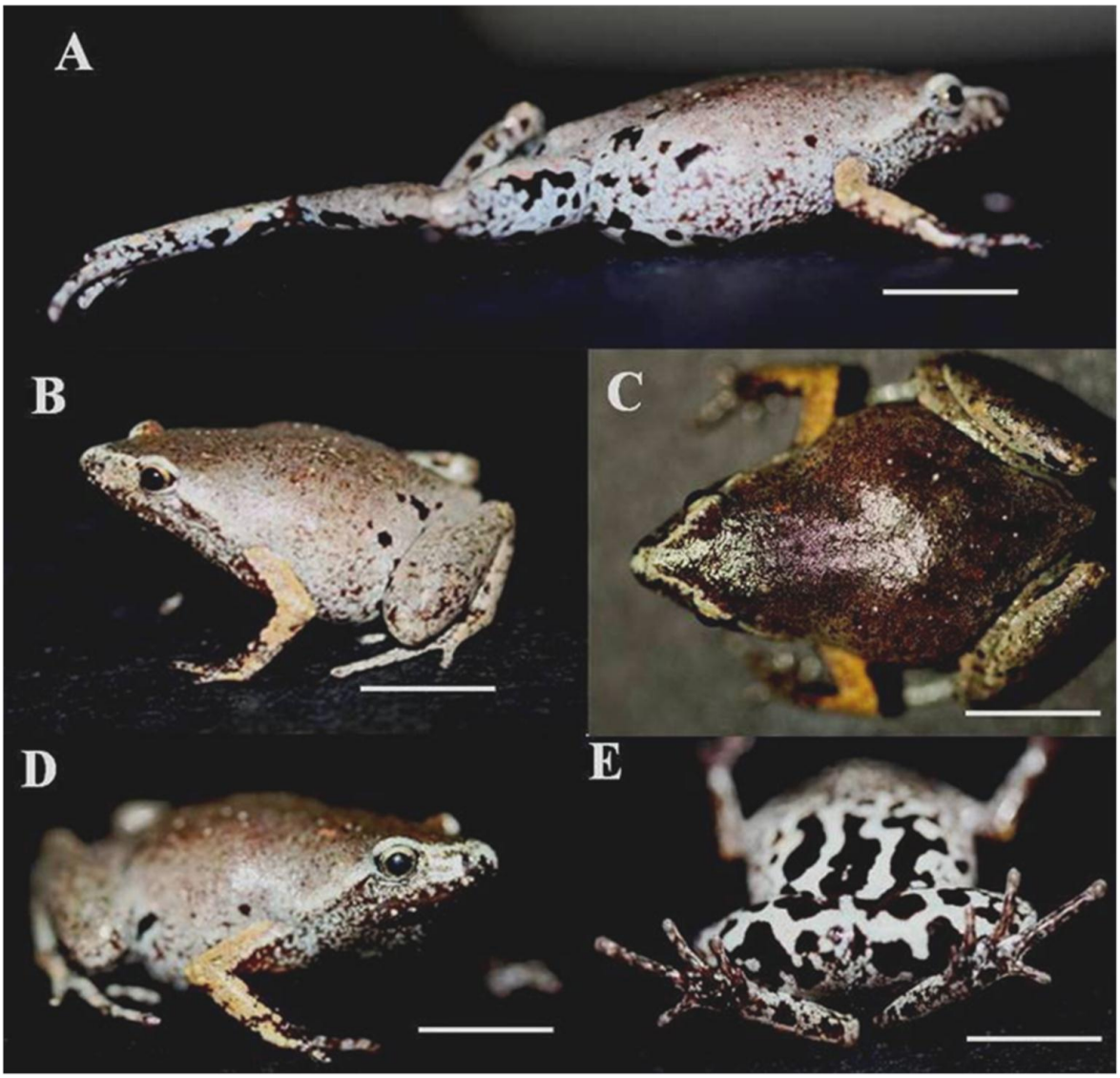


Figura 1. Características morfológicas de *Chiasmocleis bassleri.* (A) Coloración moteada de las ingles. (B) Vista lateral izquierda. Cabeza muy pequeña en comparación del cuerpo. (C) Vista dorsal. Forma lanciforme del cuerpo. (D) Vista lateral derecha. Ojos pequeños. (E) Vista ventral, región inferior de coloración característica blanca moteada. Las barras representan 1 cm (A, B, C, D y E).

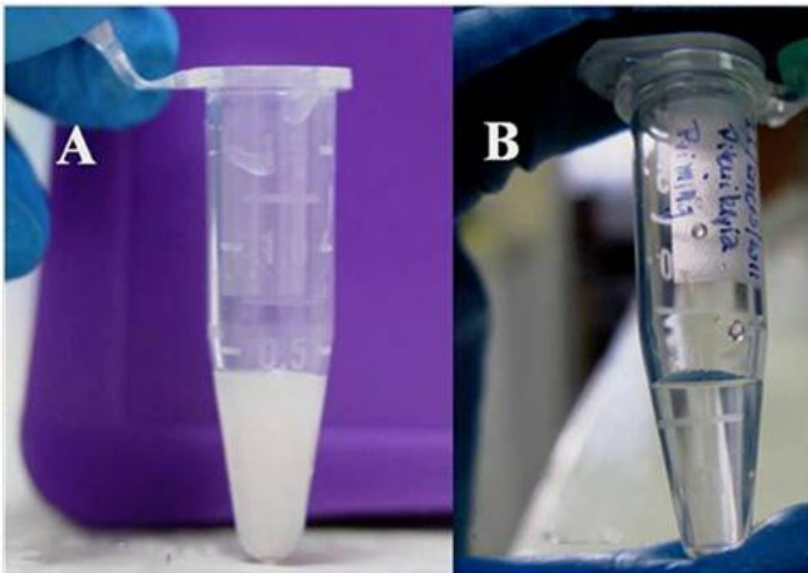


Figura 2. Extractos hormonales de pituitaria de *Rhinella marina*, a diferentes concentraciones hormonales. (A) Dosis Madre o Dosis Ovulatoria 100 % concentración, (B) Dosis Preovulatoria 10 % concentración**.**



Figura 3. Inyección hormonal en hembra de *Rhinella marina*. La solución hormonal es inyectada en la región ventral, intraperitonialmente.

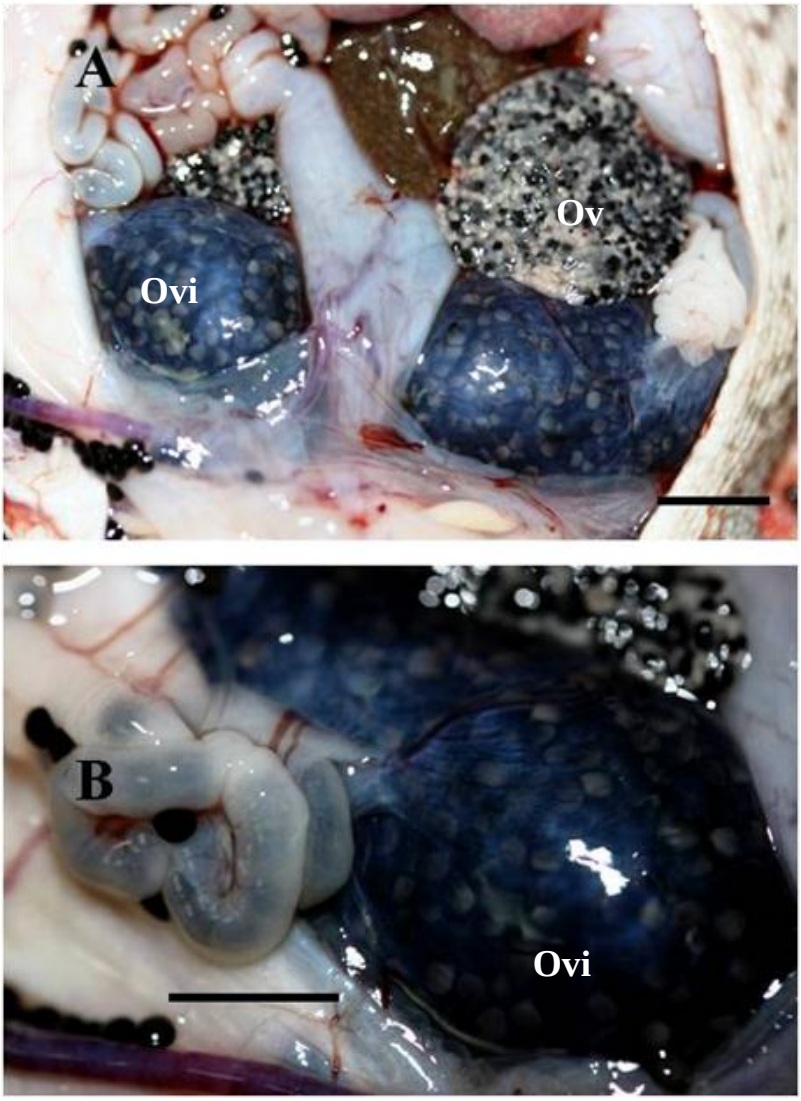


Figura 4. Ovarios y ovisacos de *Rhinella marina* después de haber sido inducidos hormonalmente con dos señales estimulantes. (A) Corte a un costado de la línea media del cuerpo, vista de ovarios. (B) Ovisaco llenos de huevos. Las barras representan 1,5 cm (A), 2 cm (B). Ov: ovario, Ovi: ovisaco.

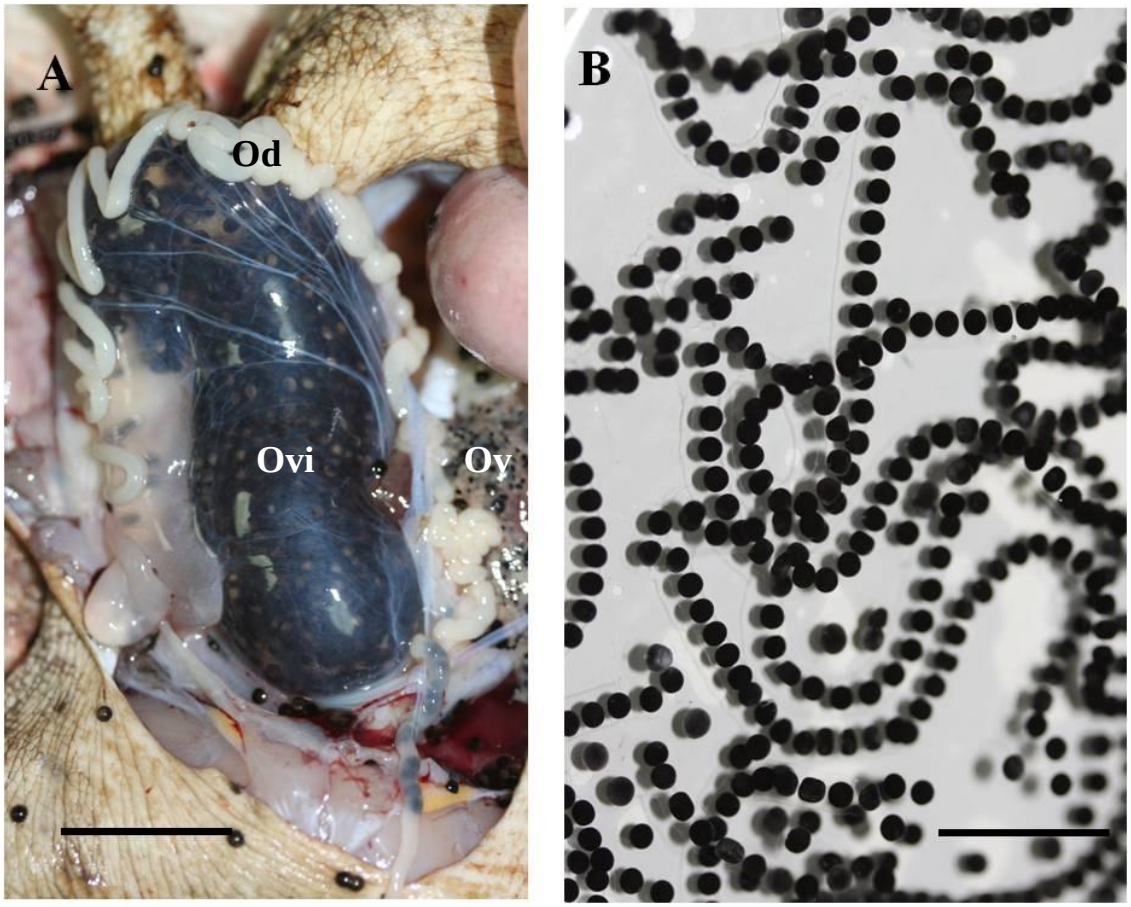


Figura 5. Extracción de los huevos de *Rhinella marina.* (A) Remoción de los ovisacos de la cavidad abdominal. (B) Hileras de huevos en cajas petri. Las barras representan 2,5 cm (A y B). Ov: ovario, Ovi: ovisaco, Od: oviducto.

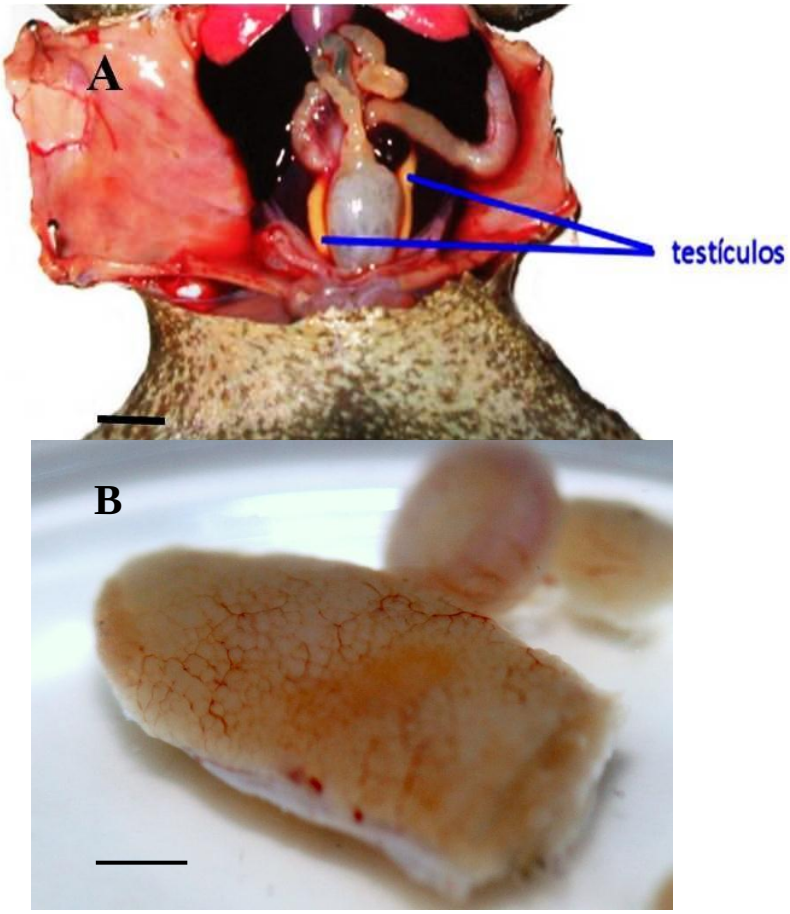


Figura 6. Extracción de testículos. (A) Testículos ubicados bajo los riñones. (B) Testículos en solución salina. Las barras representan 1 cm (A), 0,25 cm (B).

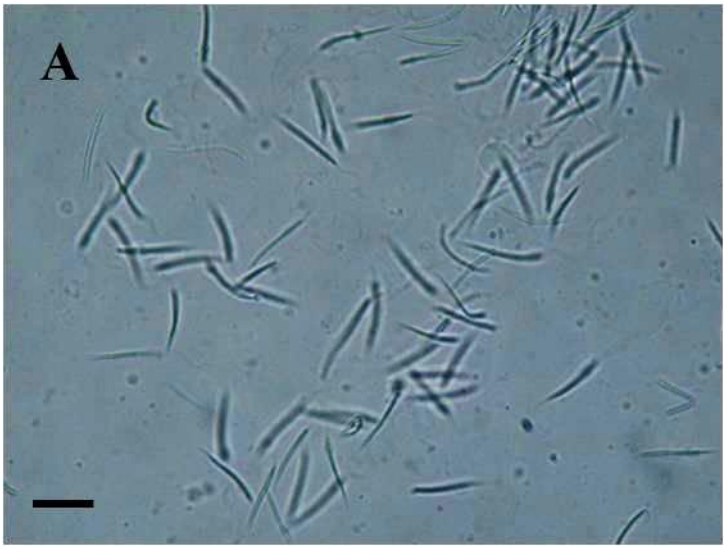


Figura 7. Espermatozoides de *Rhinella marina*. Micrografías de espermatozoides vivos a una magnitud de 100x. La barra representa 50 µm (A)



Figura 8. Fertilización *in vitro* de *Rhinella marina*. Huevos fertilizados y sumergidos en agua reposada. La barra representa 5 cm.

Estadísticos de contraste

	Horas	Huevos Fecundados	Frecuencia
Chi-cuadrado	.000[a]	640.127[a]	2920.254[b]
Grados de libertad	1	1	3
Significación asintótica	1.000	.000	.000

a. 0 casillas (.0 %) tienen frecuencias esperadas menores que 5. La frecuencia de casilla esperada mínima es 6300.0.

b. 0 casillas (.0 %) tienen frecuencias esperadas menores que 5. La frecuencia de casilla esperada mínima es 3150.0.

Figura 9. Prueba de Chi cuadrado. El resultado de este análisis, muestra diferencias altamente significativas al presentar una significancia menor a 0,05 entre 36 y 48 horas de dosis preovulatoria. Con respecto al número de huevos fecundados.

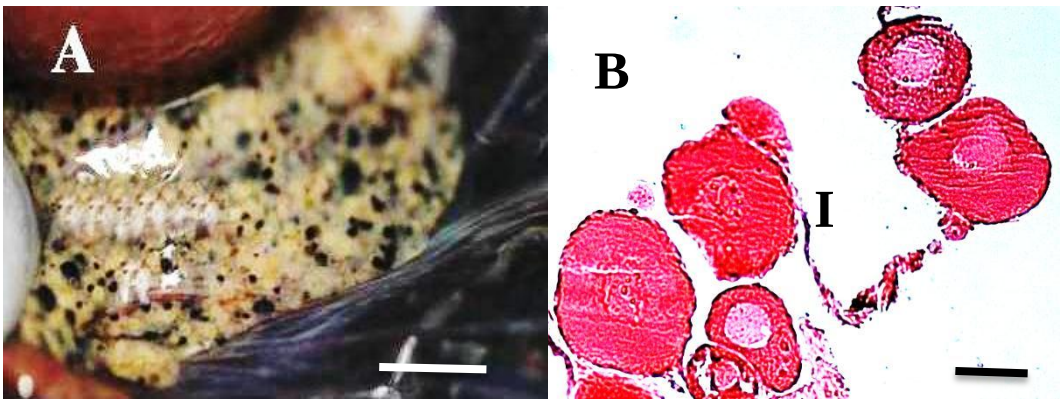


Figura 10. Ovario de *Rhinella marina* después de la ovulación. (A) Ovario con oocitos translúcidos, blanquecinos y pigmentados en menor número. (B) Micrografía de una parte translúcida del ovario, oocitos en estadio I. Las barras representan 1 cm (A); 100 µm; (B).



Figura 11. Ovulaciones de *Rhinella marina* producto de estimulaciones hormonales con extractos de pituitaria. (A) Ovulación producto de 36 horas de dosis preovulatoria mas 12 horas de dosis ovulatoria. (A´) Hilera de huevos extraídos de ovisacos de la figura A. (B) Ovulación producto de 48 horas de dosis preovulatoria más 12 horas de dosis ovulatoria. (B´) Hilera de huevos extraídos del ovisaco de la figura B. Las barras representan 1,5 cm (A y A´) y 2 cm (B y B´). Ov: ovario, Ovi: ovisaco.

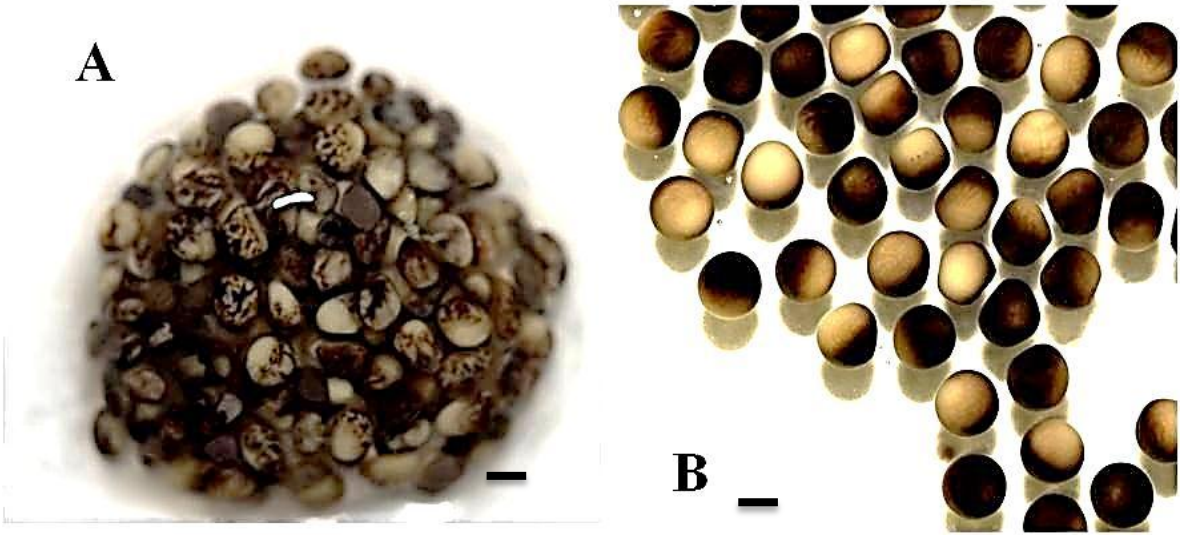


Figura 12. Ovulaciones en *Chiasmocleis bassleri* producto de estimulaciones hormonales. (A) Estimulación con dos dosis hormonales: ovisaco completo rodeado de gelatina con huevos en los cuales no se diferencia muy bien el polo animal del vegetal. (B) Estimulación con una sola dosis hormonal: huevos claramente pigmentados hacia el polo animal. Las barras representan 1 cm (A), 800 µm (B)

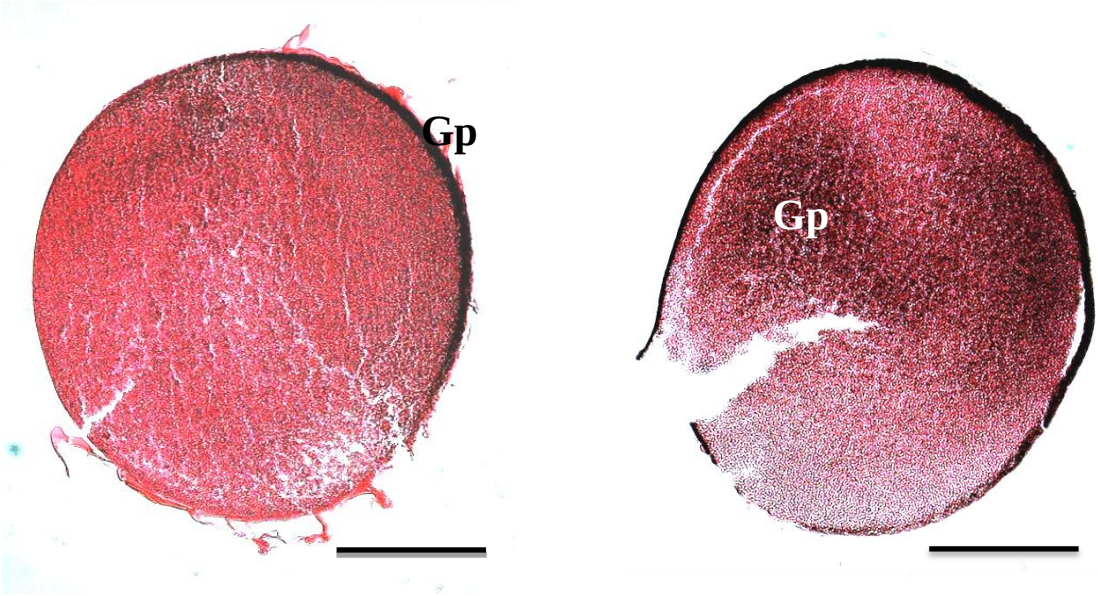


Figura 13. Cortes histológicos de huevos de *Rhinella marina* y *Chiasmocleis Bassleri*. Los huevos de ambas especies presentan gránulos de pigmentos en el polo animal (A y B). (A) Huevo de *Chiasmocleis bassleri* presenta los gránulos de pigmento restringidos al cortex del polo animal. (B) Huevo de *Rhinella marina* en el cual se observa que los gránulos de pigmento están ubicados en todo el polo animal. La barra representa 400 µm (A) y 520 µm. Gp: gránulos de pigmento.

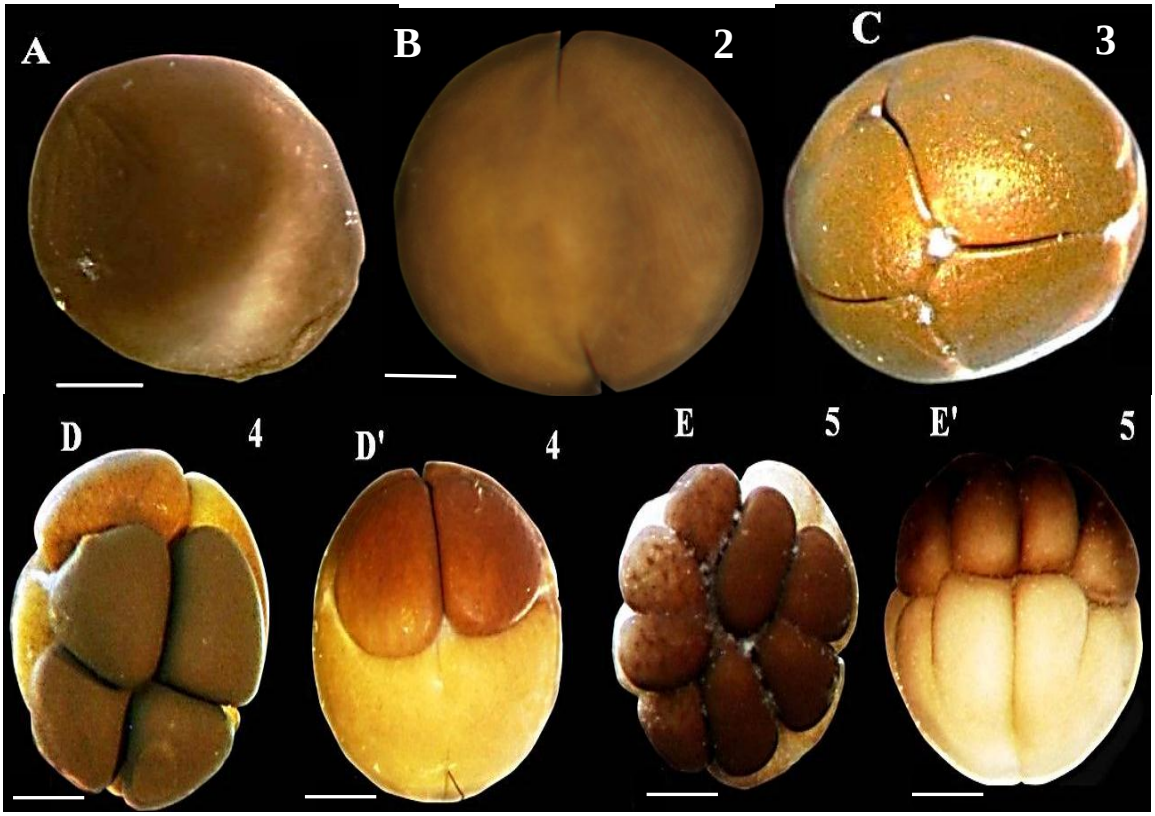


Figura 14. Descripción morfológica de los estadios del desarrollo temprano de *Rhinella marina.* (A) Estadio 1: huevo con el polo animal lateralmente hacia arriba. (B) Estadio 2: primer clivaje, dos blastómeras en vista frontal del polo animal. (C) Estadio 3: segundo clivaje, cuatro blastómeras en vista frontal al polo animal. (D) Estadio 4: tercer clivaje, ocho blastómeras en vista frontal al polo animal. (D´) Estadio 4: vista lateral. (E) Estadio 5: Cuarto clivaje, dieciséis blastómeras en vista frontal al polo animal. (E´) Estadio 5: dieciséis macrómeras. Las barras representan 0,40 mm (A-C) y 0,30 mm (D – E´) y el número en el margen superior derecho indica el estadio.

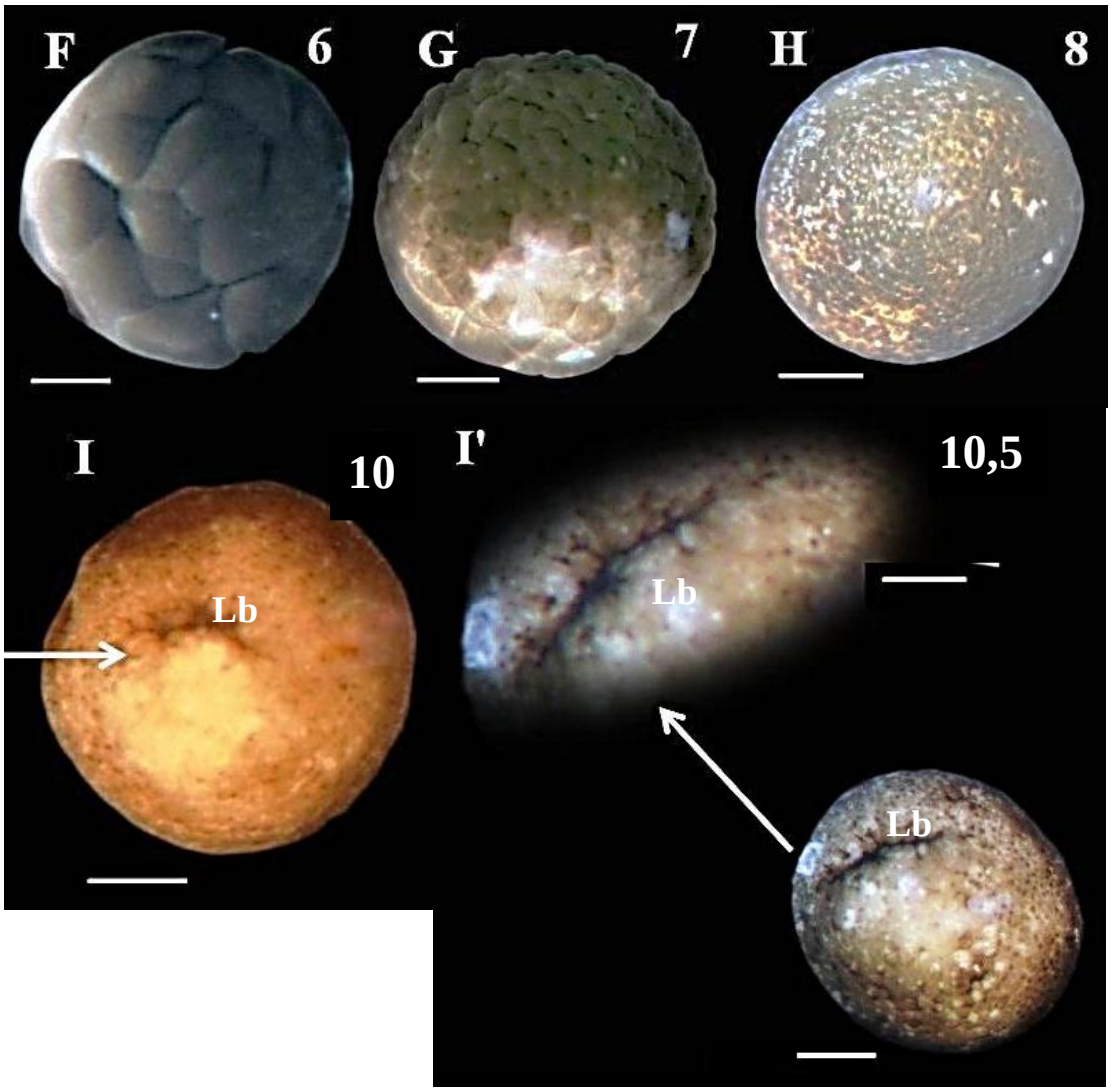


Figura 14. (Continuación) Descripción morfológica de los estadios del desarrollo temprano de *Rhinella marina.* (F) Estadio 6: quinto clivaje, 32 blastómeras. (Embrión con gelatina) en vista frontal el polo animal. (G) Estadio 7: vista animal vegetal, más de 32 células. (H) Estadio 8: Inicio de la blástula, más de 64 blastómeras en vista frontal al polo animal. (I) Estadio 10: vista dorsal, inicio de la gástrula, la flecha indica el labio dorsal del blastoporo. (I´) Estadio 10,5: vista dorsal, ampliación del Lb. Lb: labio dorsal del blastoporo. Las barras representan 0,50 mm (F- H´), 0,55 (I), 0.40 mm (I´) y 0,20 mm (I´) (ampliación). El número en el margen superior derecho indica el estadio.

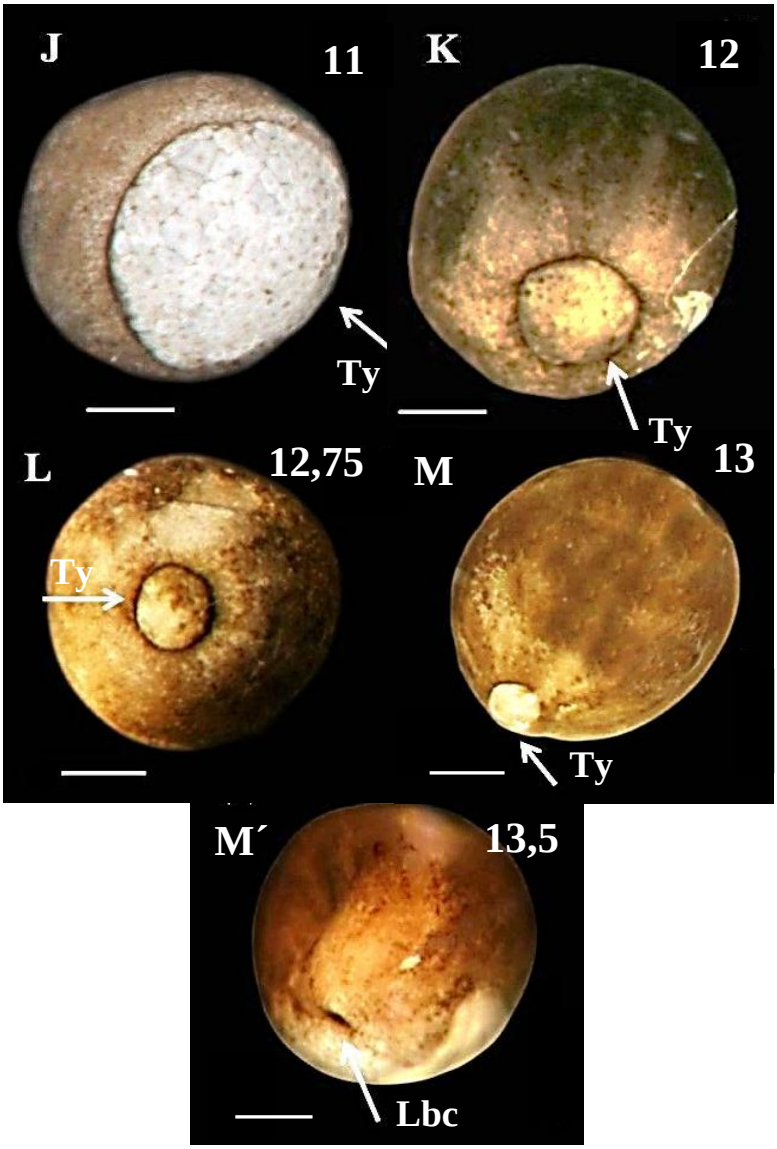


Figura 14. (Continuación) Descripción morfológica de los estadios del desarrollo temprano de *Rhinella marina*. (J) Estadio 11: gástrula temprana, la flecha señala el tapón de yema. (K) Estadio 12: gástrula media, la flecha señala el tapón de yema. (L) Estadio 12, 75: gástrula media, tapón de yema más pequeño. (M) Estadio 13: gástrula tardía, tapón de yema reducido. (M´) Estadio 13, 5: gástrula tardía avanzada, se ve el blastoporo cerrado. Ty: tapón de yema, Lbc: labio del blastoporo cerrado. La barra representa 0, 5 mm (J), 0, 80 mm (K) y 0, 60 mm (L- M´) y el número en el margen superior derecho indica el estadio.

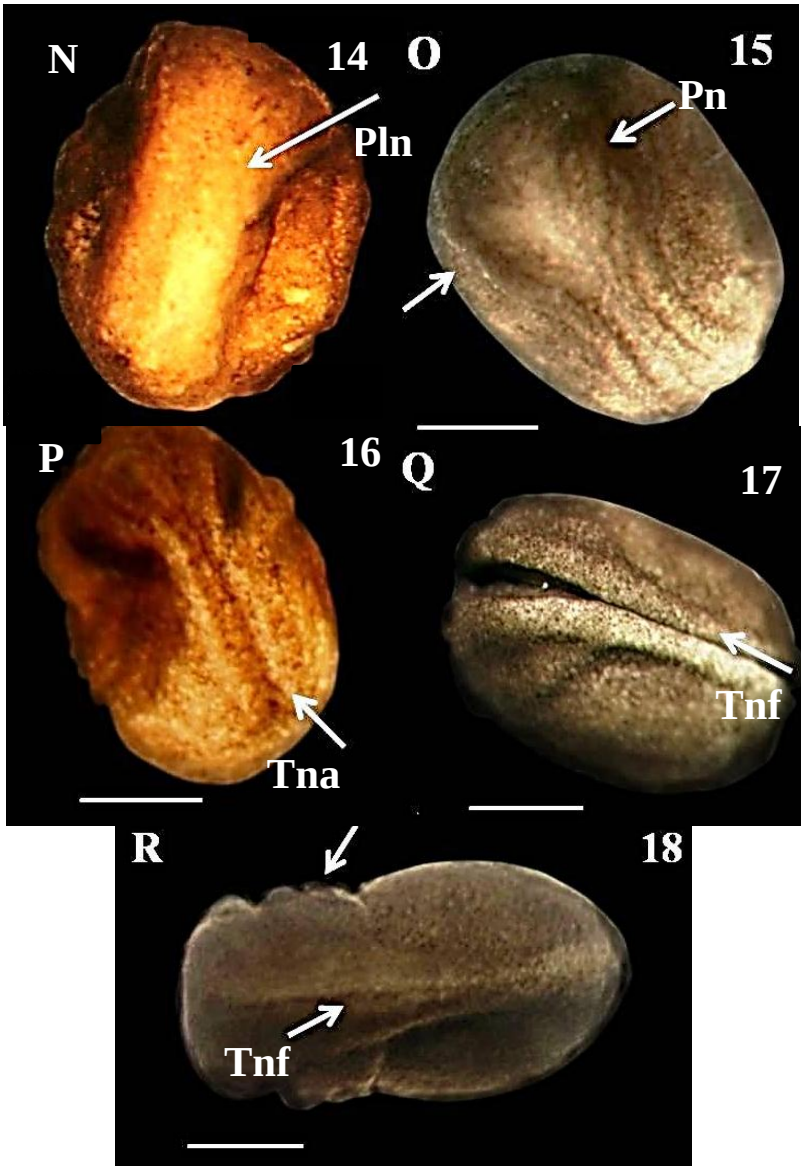


Figura 14. (Continuación) Descripción morfológica de los estadios del desarrollo temprano de *Rhinella marina*. (N) Estadio 14: Estadios de la neurulación: inicio de la placa neural. (O) Estadio 15: se ven los pliegues neurales. (P) Estadio 16: tubo neural abierto. (Q) Estadio 17: tubo neural cerrado hacia la región caudal. (R) Estadio 18: tubo neural fusionado totalmente presencia de abultamientos branquiales lateralmente. Pln: placa neural, Pn: pliegues neurales, Tna: tubo neural abierto, Tnf: tubo neural fusionado. La barra representa 0,70 mm (N - P); 0.75 mm (Q y R) y el número en el margen superior derecho indica el estadio.

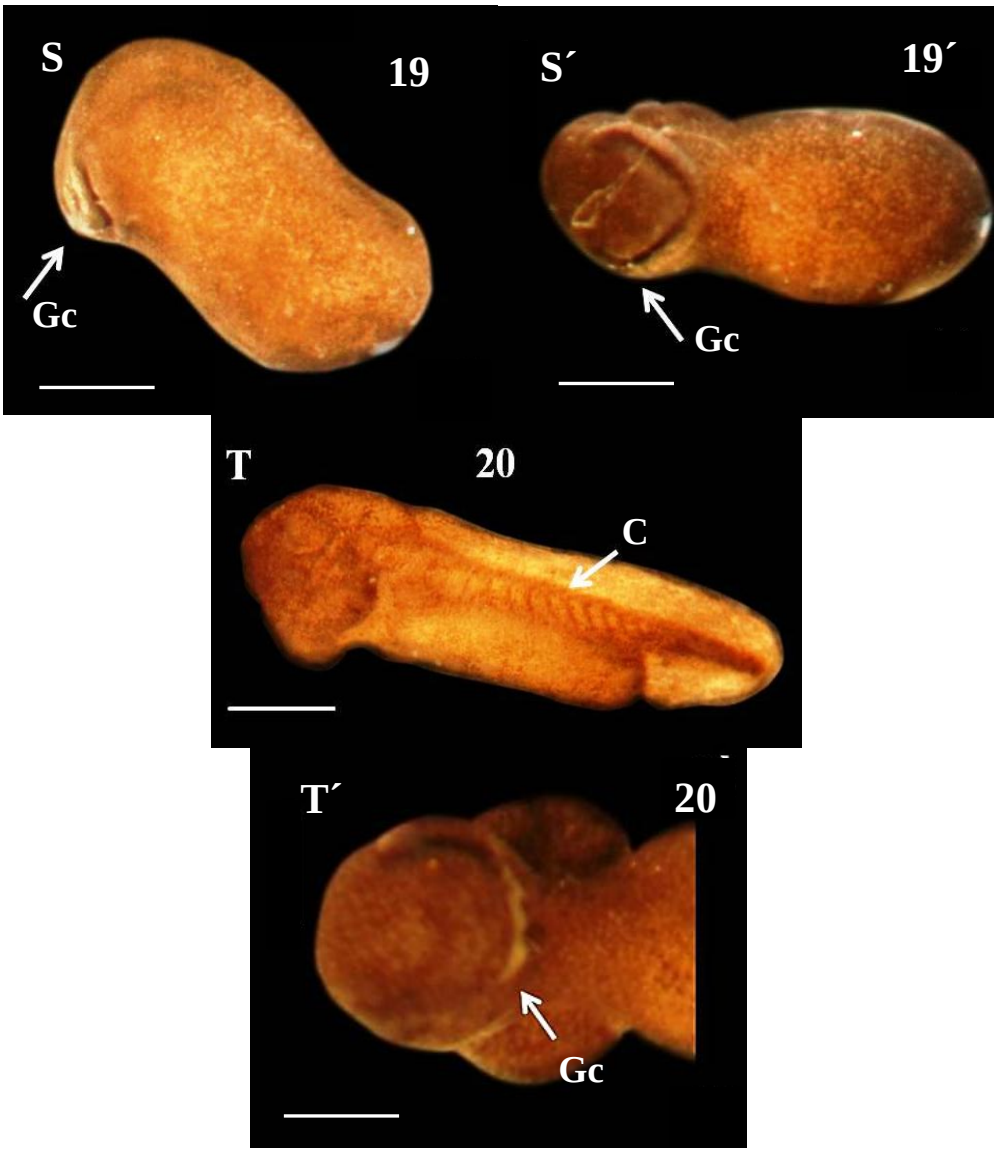


Figura 14. (Continuación) Descripción morfológica de los estadios del desarrollo temprano de *Rhinella marina.* (S y S´) Estadio 19: vista lateral, inicio del desarrollo de glándula de cemento. (T′) Estadio 20: vista lateral, arcos branquiales. (T´) Estadio 20: vista ventral de la cabeza, glándula de cemento. Gc: glándula de cemento. Las barras representan 0, 85 mm (S y S´) y 0, 95 mm; (T y T´) y el número en el margen superior derecho indican el estadio.

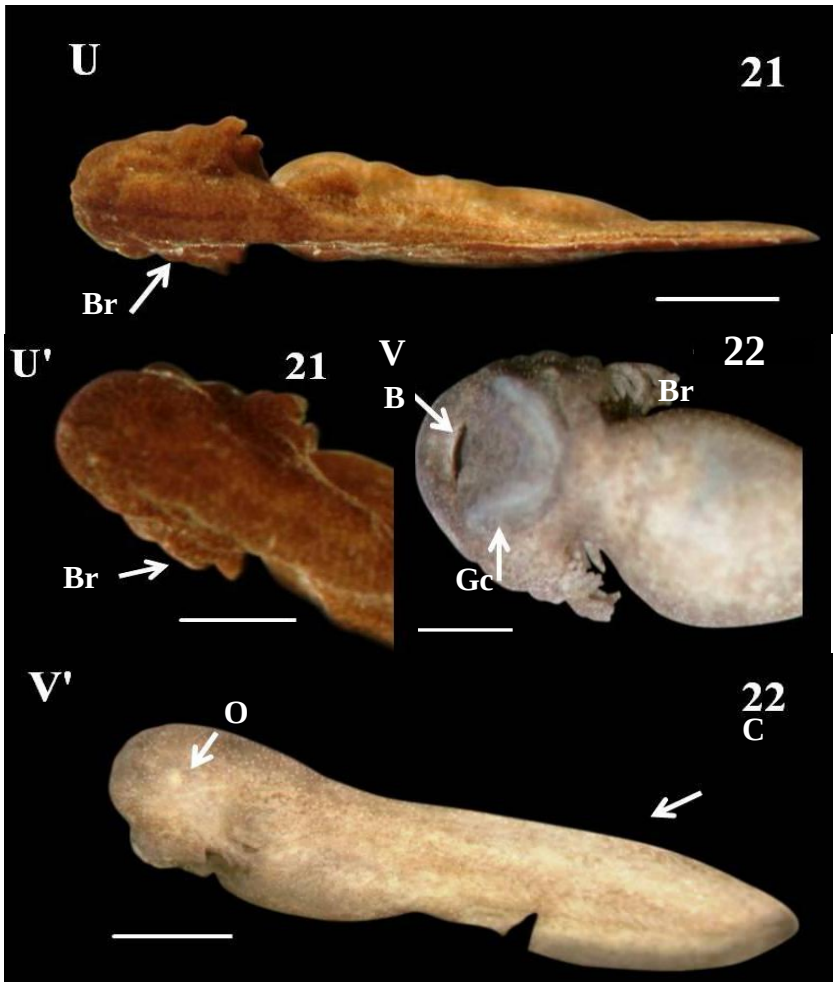


Figura 14. (Continuación) Descripción morfológica de los estadios del desarrollo temprano de *Rhinella marina.* (U) Estadio 21: vista dorsal del embrión, externalización de las branquias. (V) Estadio 22: vista ventral de la cabeza, se observa la apertura de la boca, la glándula de cemento casi inexistente y las branquias ramificadas. (V´) Estadio 22: se transparentó la córnea y se produjo el alargamiento del ala de la cola. Br: branquias, B: boca, Gc: glándula de cemento, O: ojo, C: cola. La barra representa 0,80 mm (U- V´) y el número en el margen superior derecho indica el estadio.

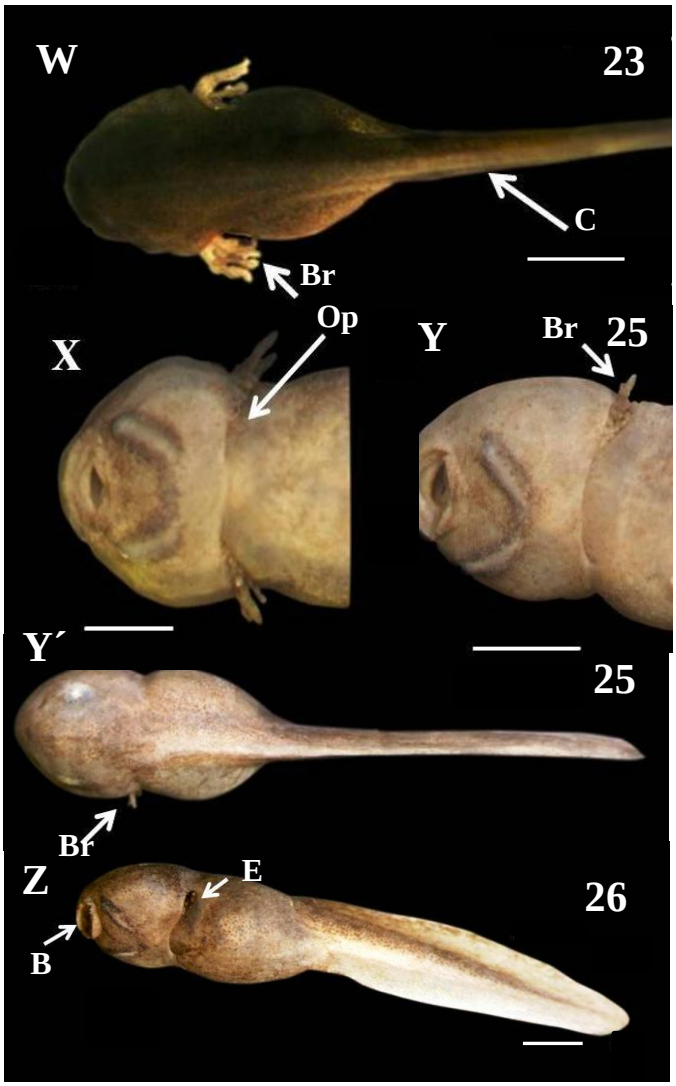


Figura 14. (Continuación) Descripción morfológica de los estadios del desarrollo temprano de *Rhinella marina.* (W) Estadio 23: branquias ramificadas y alargamiento de la cola. (X) Estadio 24: aparecimiento del opérculo hacia la base de las branquias. (Y) Estadio 25: opérculo encierra las branquias y solo se ve la branquia izquierda en vista ventral. (Z) Estadio 26: larva en vista ventral que muestra el disco oral formado y la aparición de un espiráculo. Br: branquia, C: cola, Op: opérculo, E: espiráculo, B: boca. La barra representa 1,15 mm (W- Y´) y 0,70mm (X y Y). El número en el margen superior derecho indica el estadio.

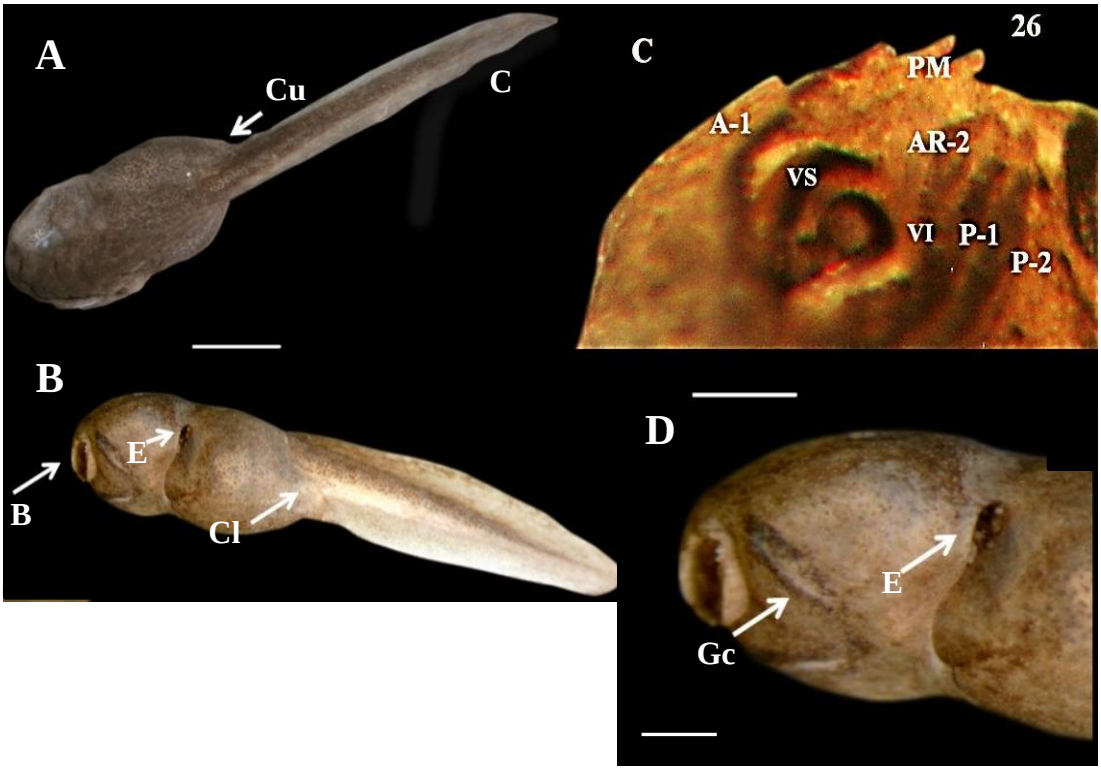


Figura 15. Morfología externa del renacuajo de *Rhinella marina* estadio 26 (A) Vista dorsal, se aprecia los ojos el cuerpo y la cola. (B) Vista ventral, las flechas indican disco oral, espiráculo y cloaca. (C) Vista ventral de la cavidad oral, VS: vaina mandibular superior, VI: vaina mandibular inferior, A-1: primera hilera anterior de dientes, AR-2: segunda cresta dentaria anterior, P-1: primera hilera posterior de dientes, P-2: segunda hilera posterior de dientes, PM: papilas marginales. (D) Vista ventral del cuerpo, remanentes de la glándula de cemento, espiráculo. O: ojo, Cu: cuerpo, C: cola, B: boca, E: espiráculo, Cl: cloaca, Gc: glándula de cemento. Las barras representan 1,40 mm (A y B), 0, 10 mm (C), 1 mm (D) y el número en el margen superior derecho indica el estadio.

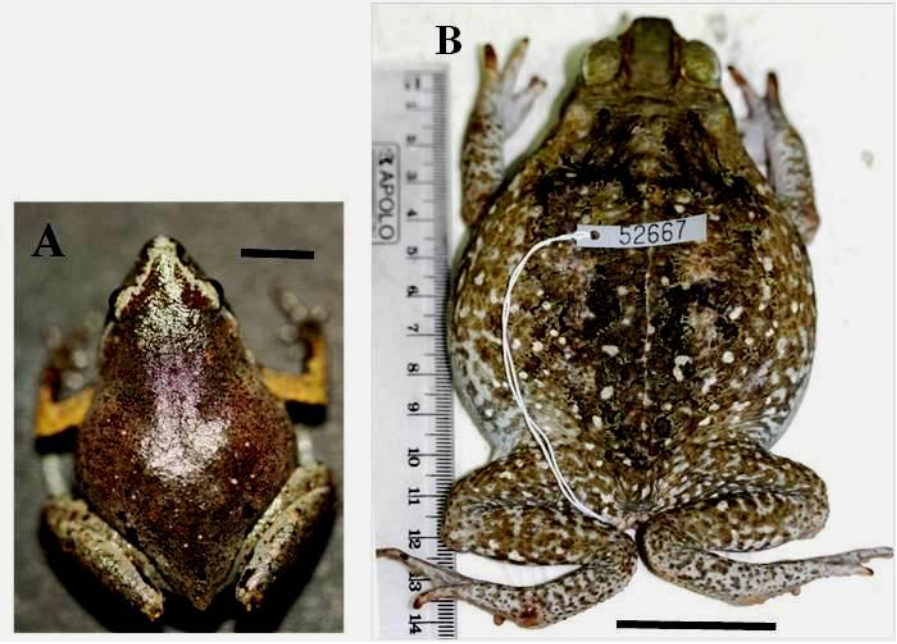


Figura 16. Longitud rostro cloacal de las especies de estudio. (A) *Chiasmocleis bassleri* 4, 5 cm LRC. (B) *Rhinella marina* 13 cm LRC.

10.TABLAS

Tabla 1. Localidades de colección de *Rhinella marina,* número de individuos colectados y ensayos realizados

Localidad	Fecha de colección	Ensayo	Número de Individuos	
			Hembras	Machos
El Matal, Manabí	Septiembre 2009	D. preovulatoria	20	4
El Matal, Manabí	Septiembre 2010	Ovulación	10	4
El Matal, Manabí	Octubre 2011	Ovulación	15	3
El Matal, Manabí	Febrero 2012	Ovulación	3	1

Tabla 2. Ensayos de tiempos de 24, 36, 48 y 60 horas de dosis preovulatoria en *Rhinella marina*

Fecha de colección Hembra Inducida	Fecha del ensayo	Tiempo de dosis preovulatoria	Pituitaria usada		Resultado	
			Hembra	Macho	Ovulación	Calidad
Septiembre 2009	Abril 2010	24 horas		x	Nulo	-
Septiembre 2009	Abril 2010	36 horas		x	Nulo	-
Septiembre 2009	Abril 2010	48 horas		x	Nulo	-
Septiembre 2009	Abril 2010	60 horas		x	Nulo	-
Septiembre 2009	Abril 2010	24 horas	x		Nulo	-
Septiembre 2009	Agosto 2011	24 horas	x		Nulo	-
Septiembre 2009	Abril 2010	36 horas	x		Si	No degradada
Septiembre 2009	Agosto 2011	36 horas	x		Si	No degradada
Septiembre 2009	Abril 2010	48 horas	x		Si	Parcialmente degradada
Septiembre 2009	Agosto 2011	48 horas	x		Si	Parcialmente degradada
Septiembre 2009	Abril 2010	60 horas	x		Si	Degradada
Septiembre 2009	Agosto 2011	60 horas	x		Si	Degradada

No degradada: Huevos dentro de los ovisacos. Con una diferenciación de coloración bien definida para el polo animal y el vegetal.

Parcialmente degradada: cuadro similar al de 36 h, pero los huevos en el ovisaco se tornaron algo café y además se no se diferencian bien los polos animal y vegetal.

Degradada: similar al de 48 h, todos los huevos se veían licuados y café. No se diferencia el polo animal del vegetal.

Tabla 3. Ensayos de inducción a la ovulación en *Rhinella marina*

Fecha de colección Hembra Inducida	Fecha de ensayo	Hembra inducida		Hembra donadora		Ovulación
		QCAZ-A	cm LRC	QCAZ-A	LRC(cm)	
Septiembre 2009	Octubre 2010	-	13-15	-	13-15	si
Septiembre 2009	Octubre 2010	-	13-15	-	13-15	si
Septiembre 2009	Octubre 2010	-	13-15	-	13-15	si
Septiembre 2009	Octubre 2010	-	13-15	-	13-15	si
Septiembre 2009	Octubre 2010	-	13-15	-	13-15	no
Octubre 2011	Octubre 2011	52304	11	52310	9	no
Octubre 2011	Octubre 2011	52305	10	52309	8,5	no
Octubre 2011	Octubre 2011	52306	12,5	52305/52311	8,5/9,5	no
Octubre 2011	Noviembre 2011	-	10,5	52312	9,5	no
Octubre 2011	Enero 2012	52308	14	52300	9	no
Octubre 2011	Enero 2012	52302	11	-	10,5	si
Octubre 2011	Enero 2012	52307	11	52301/52303	9/9	si
Febrero 2012	Febrero 2012	52668	12,5	52667	12,5	si
Febrero 2012	Febrero 2012	52669	12	*pituitaria de macho	9	no

Tabla 4. Tabla parcial del desarrollo de *Rhinella marina*, comparada con las tablas y descripciones de etapas en el desarrollo temprano de anuros, según Nieuwkoop y Faber (1994), Gosner (1960) y Limbaugh y Volpe (1957).

Eventos del desarrollo temprano	Tiempo post fertilización: Horas	Días	Estadio R	X	G	B
Fertilización	-	-	1	1	1	1
Media luna gris (no se pudo fotografiar)	1 hora: 40 minutos	-	2	1+	2	2
Primer clivaje: 2 células	2 horas: 15 minutos	-	2+	2	3	3
Segundo clivaje: 4 células	2 horas: 25 minutos	-	3	3	4	4
Tercer clivaje: 8 células	2 horas: 35 minutos	-	4	4	5	5
Cuarto clivaje: 16 células	4 horas: 45 minutos	-	5	5	6	6
Quinto clivaje: 32 células	5 horas: 5 minutos	-	6	6	7	-
+ 32 células	5 horas: 25 minutos	-	7	7	8	7
Blástula + 64 células	6 horas: 40 minutos	-	8	8	8+	8
Blástula media			9	9	9	9
Inicio de la gástrula (apareció labio del blastoporo)		1 día: 11 horas	10+	10	10	10
Gástrula temprana (tapón de yema)		1 día: 19 horas	11	11	11	11
Gástrula media (reducción tapón de yema)		2 días: 2 horas	12	12	12	11
Gástrula media (reducción tapón de yema)		2 días: 17 horas	12+	12+	12	12
Gástrula tardía (muy reducido tapón de yema)		3 días: 4 horas	13	13	13	12
Gástrula tardía (cierre del blastoporo)		3 días: 18 horas	13+	14	14	12
Inicio neurula: placa neural		3 días: 23 horas	14	15	14	13
Neurula media: Pliegues neurales inicio		4 días: 2 horas	15	17	15	14
Neurula media: Surco neural		4 días: 6 horas	16	20	16	15
Neurula media: Tubo neural		4 días: 9 horas	17	24	17	16
Neurula tardía: tubo neural completo, abultamiento de futuras branquias		6 días: 00 horas	18	26	18	16
Cuerpo de la cola: formación de glándula de cemento		7 días: 17 horas	19	-	-	17
Primeros nacimientos		8 días :10 horas	19+	33	19	17
Contracciones musculares, arcos branquiales, fosas nasales		10 días:6 horas	20	40	20	18
Comienzo de latidos del corazón, externalizan las branquias		11 días: 6 horas	21	40+	20+	19

Tabla 4. (Continuación) Tabla parcial del desarrollo de *Rhinella marina*, comparada con las tablas y descripciones de etapas en el desarrollo temprano de anuros, según Nieuwkoop y Faber (1994), Gosner (1960) y Limbaugh y Volpe (1957).

Eventos del desarrollo temprano	Tiempo post fertilización:		Estadio			
	Horas	Días	R	X	G	B
Se abre la boca, se transparenta la córnea, se elonga la cola e inicia la desaparición de la glándula de cemento		12 días: 7 horas	22	41	21	21
Desarrollo del ojo, ramifican las branquias, circulación en el ala de la cola		13 días: 14 horas	23	42	22	22
Opérculo cubren la base de las branquias, desarrollo de los dentículos		14 días: 14 horas	24	43	23	24
Opérculo encierra a las branquias derecha,		41 días: 14 horas	25	44	24	25
Desarrollo del espiráculo		77 días: 14 horas	26	48	25	25
Patas traseras		89 días: 14 horas	27+	-	26	26
Patas delanteras			41	-	41	40
Primer subadulto			46	66	46	46

R: estadios de *Rhinella marina*

X: estadios embrionarios según la tabla normal del desarrollo de *Xenopus laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994)

G: estadios embrionarios según la tabla normal de desarrollo de Gosner (1960)

B: estadios embrionarios identificados en el desarrollo temprano de *Bufo valliceps* (Limbaugh y Volpe, 1957)

Tabla 5. Inducción a la Ovulación en *Chiasmocleis bassleri* usando extractos de glándula pituitaria de *Rhinella marina*

Inducción a la Ovulación en *Chiasmocleis bassleri*						
QCAZ-A	% concentración 1	% concentración 2	Horas esperadas	Ovulación	# huevos aprox.	Calidad de huevos
53441	10	90	48	si	70	Degradada
53443	10	90	48	si	200	Degradada
53444	12	-	23	si	250	Degradada
53445	15	-	16	si	240	Parciamente degradada 1
53446	15	-	16	si	236	Parciamente degradada 1
53447	15	-	17	si	250	No degradada
53448	15	-	18	si	182	No degradada
53449	15	-	19	si	178	No degradada
53450	15	-	19	si	98	No degradada
53451	15	-	20	si	143	Parciamente degradada 2
53452	15	-	21	si	80	Parciamente degradada 2
53453	15	-	22	si	60	Parciamente degradada 2

Degradada: no se diferencia en la coloración el polo animal del vegetal y se tornaron de un color café oscuro

Parcialmente degradada 1: huevos con un color gris para el polo animal un blanquecino para el vegetal, un 50% de los huevos aun no llegaban al ovisaco.

No degradada: huevos bien definidos la ubicación de los polos y además más del 90% de huevos en el ovisaco.

Parcialmente degradada 2: ovisacos llenos de huevos pero con coloraciones café claro y una difusión de colores

Tabla 6. Resultados de inducción a la ovulación en *Rhinella marina*

Fecha de colecta de hembra inducida	Fecha de ensayo	Resultados	
		Positivo	Negativo
Septiembre 2009	Octubre 2010	4	1
Octubre 2011	Octubre 2011	0	3
Octubre 2011	Noviembre 2011	0	1
Octubre 2011	Enero 2012	2	1
Febrero 2012	Febrero 2012	1	0

Tabla 7. Resultados de los 3 últimos ensayos de fertilización *in vitro* de *Rhinella marina* inducidos hormonal con una dosis preovulatoria de 36 horas y una dosis ovulatoria de 12 horas

% de Procesos	Observaciones
90 %	Fertilización (9000 de 10000) comenzó clivaje
70 %	Neurulación (6300 de 9000)
60 %	Estado larval (3780 de 6300)
1 %	Mortalidad (60 de 3780)

Tabla 8. Matriz empleada en el análisis del Chi cuadrado para encontrar diferencias entre los dos tratamientos (36-48 horas) de dosis preovulatoria

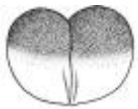
	Huevos Fertilizados	Huevos no fertilizados
36 horas	3780	2520
48 horas	1100	5200

11. ANEXOS

Anexo 1. Resumen de la tabla normal del desarrollo de *Xenopus laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994)



Stage 1 (egg), ventral view



Stage 2 (2-cell) ventral view

1 hr 30 min pf @ 23°C



Stage 3 (4-cell) dorso-lateral view

2 hr pf @ 23°C



Stage 4 (8-cell) animal view

2 hr 15 min pf @ 23°C



Stage 4 (8-cell) dorso-lateral view

2 hr 15 min pf @ 23°C



Stage 5 (16-cell) animal view

2 hr 45 min pf @ 23°C



Stage 5 (16-cell) dorsal view

2 hr 45 min pf @ 23°C



Stage 6 (32-cell) animal view

3 hr @ 23°C



Stage 6.5 blastula, dorsal view

3 hr 30 min pf @ 23°C



Stage 7 blastula, animal view

4 hr pf @ 23°C



Stage 8 blastula, animal view

5 hr pf @ 23°C



Stage 8 blastula, dorsal view

5 hr pf @ 23°C

Anexo 1. Resumen de la tabla normal del desarrollo de *Xenopus laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994)



Stage 9 blastula, vegetal view

7 hr pf @ 23°C



Stage 10 early gastrula, veg view

9 hr pf @ 23°C



Stage 10.5, vegetal view

11 hr pf @ 23°C



Stage 10.5, vegetal view

11 hr pf @ 23°C



Stage 11, vegetal view

11 hr 45 min pf @ 23°C



Stage 11.5, vegetal view

12 hr 30 min pf @ 23°C



Stage 12, vegetal view

13 hr 15 min pf @ 23°C



Stage 12.5, posterior-dorsal view

14 hr 15 min pf @ 23°C



Stage 13, posterior-dorsal view

14 hr 45 min pf @ 23°C



Stage 14, posterior-dorsal view

16 hr 15 min pf @ 23°C



Stage 15, posterior-dorsal view

17 hr 30 min pf @ 23°C



Stage 16, anterior view

18 hr 15 min pf @ 23°C

Anexo 1. Resumen de la tabla normal del desarrollo de *Xenopus laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994)



Stage 21, dorsal view

22 hr 30 min pf @ 23°C



Stage 22, dorsal view

24 hr pf @ 23°C



Stage 23, dorsal view

1 day, 45 minutes pf @ 23°C



Stage 24, dorsal view

1 day, 2 hr 15 min pf @ 23°C



Stage 25, dorsal view

1 day, 3 hr 30 min pf @ 23°C



Stage 26, dorsal view

1 day, 5 hr 30 min pf @ 23°C



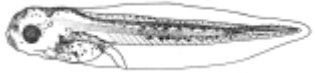
Stage 27, lateral view

1 day, 7 hr 15 min pf @ 23°C



Stage 28, lateral view

1 day, 8 hr 30 min pf @ 23°C



Stage 43, lateral view

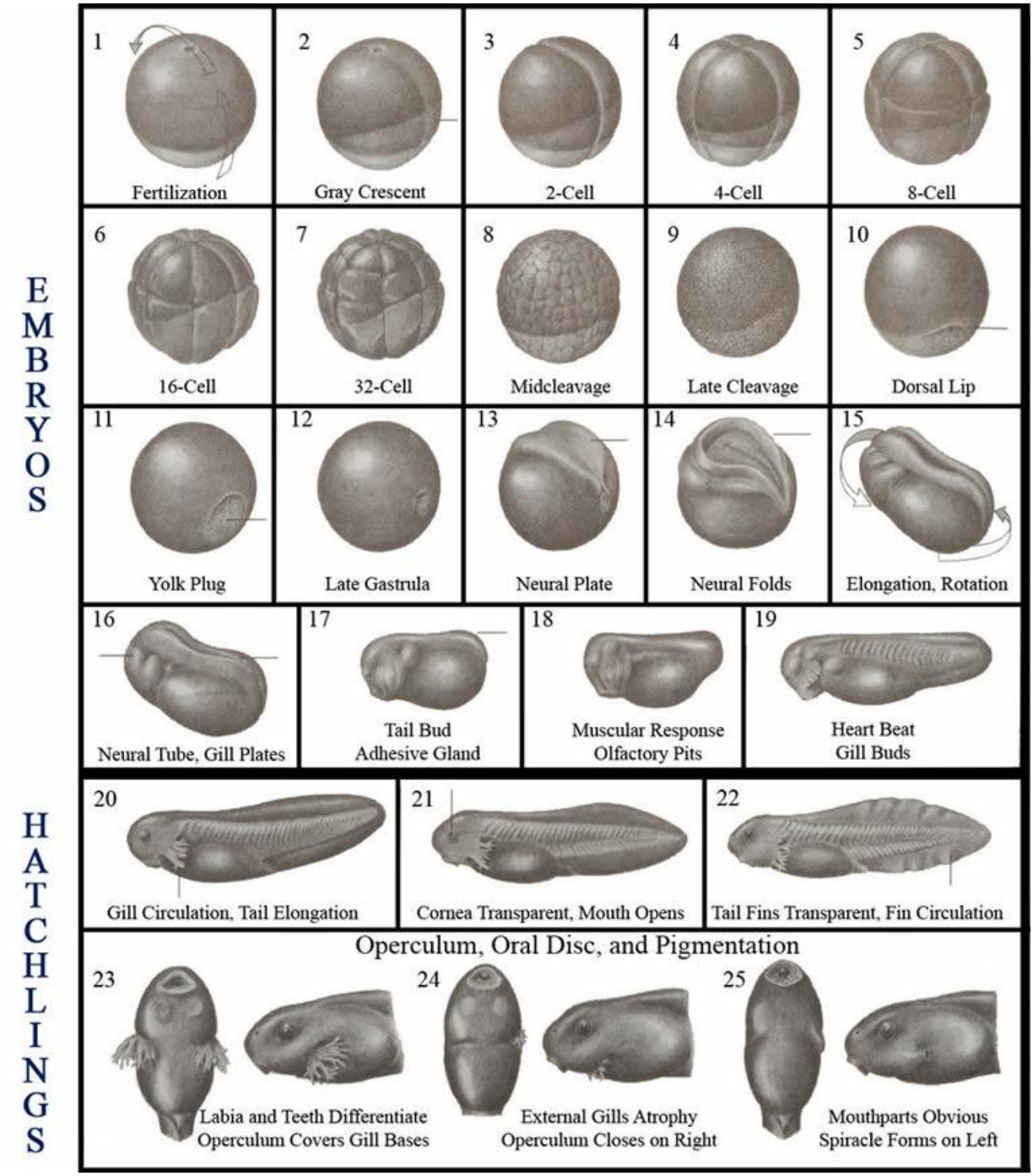
3 days, 15 hr pf @ 23°C



Stage 46, lateral view

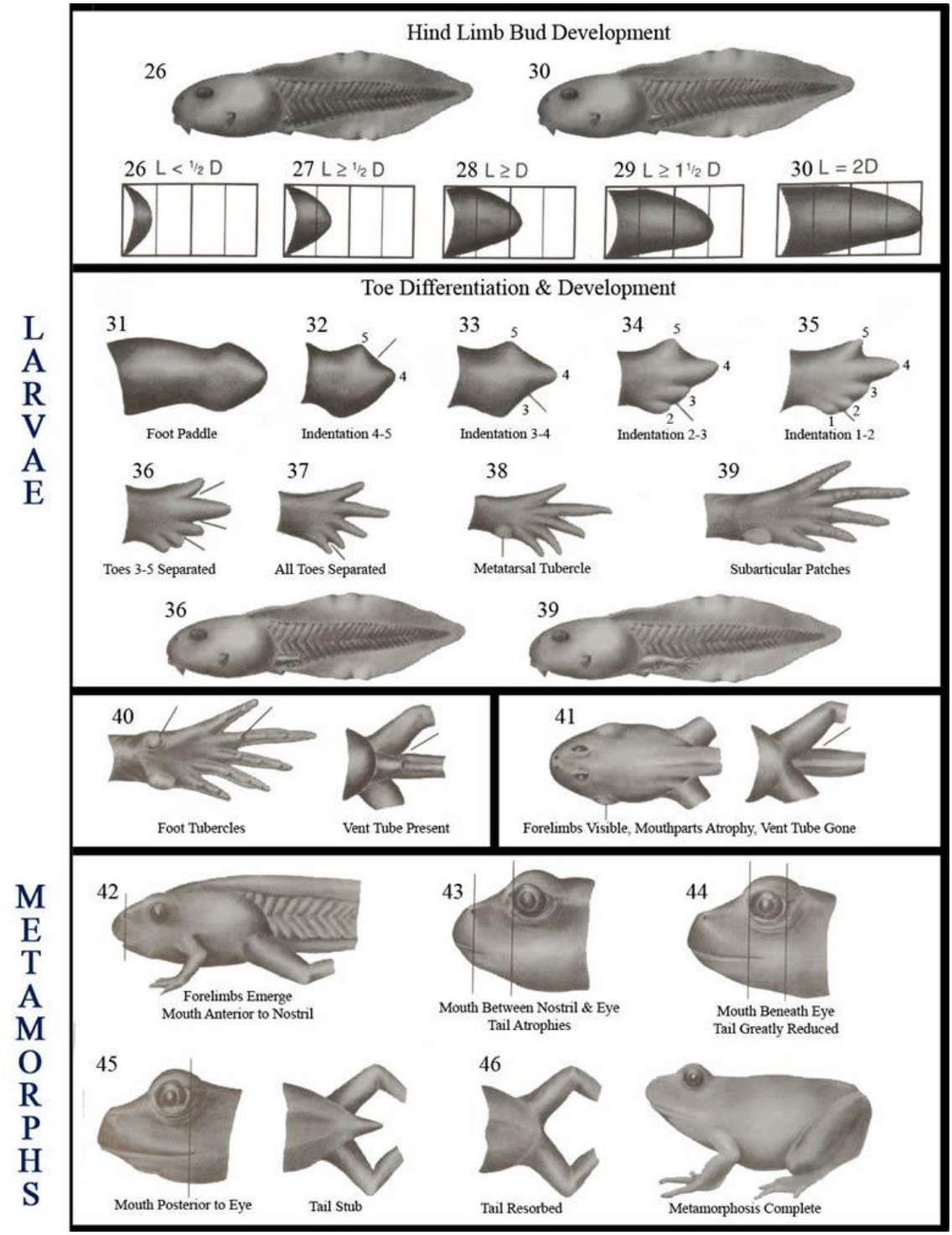
4 days, 10 hr pf @ 23°C

Anexo 2. Tabla normal del desarrollo según Gosner 1960 (Duellman *et al.*, 1986)



Anexo 2 (Continuación) Tabla normal del desarrollo según Gosner 1960

(Duellman *et al*., 1986)



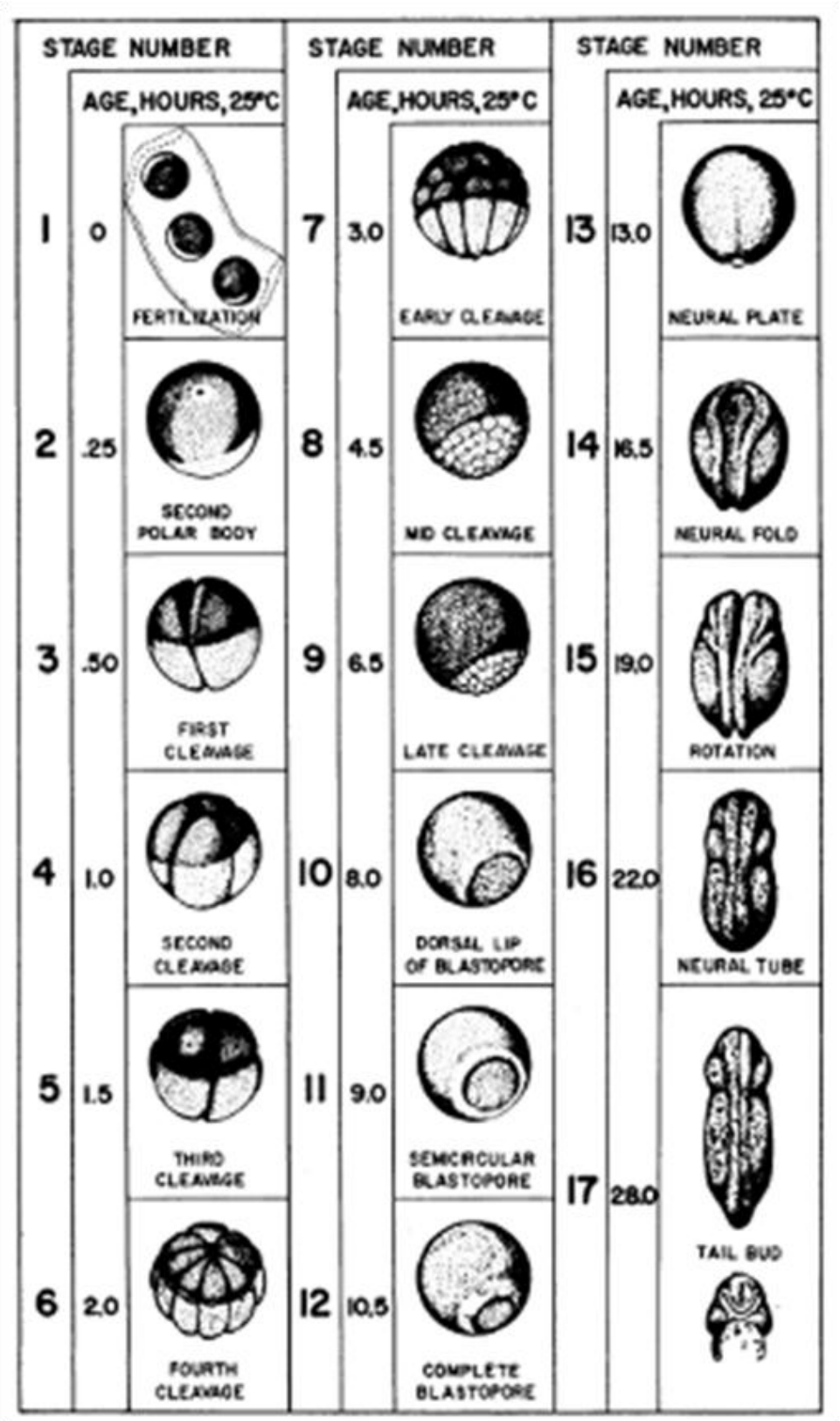
Anexo 3. Tabla de oogénesis de *Rhinella marina* (Brown, 2002). La oogénesis de *R. marina* fue clasificada en 6 estadios definidos de acuerdo a la tabla de oogénesis de Dumont (1972) para *Xenopus laevis* (Brown, 2002)

Table 1. Stages of oogenesis in *Bufo marinus*[1]

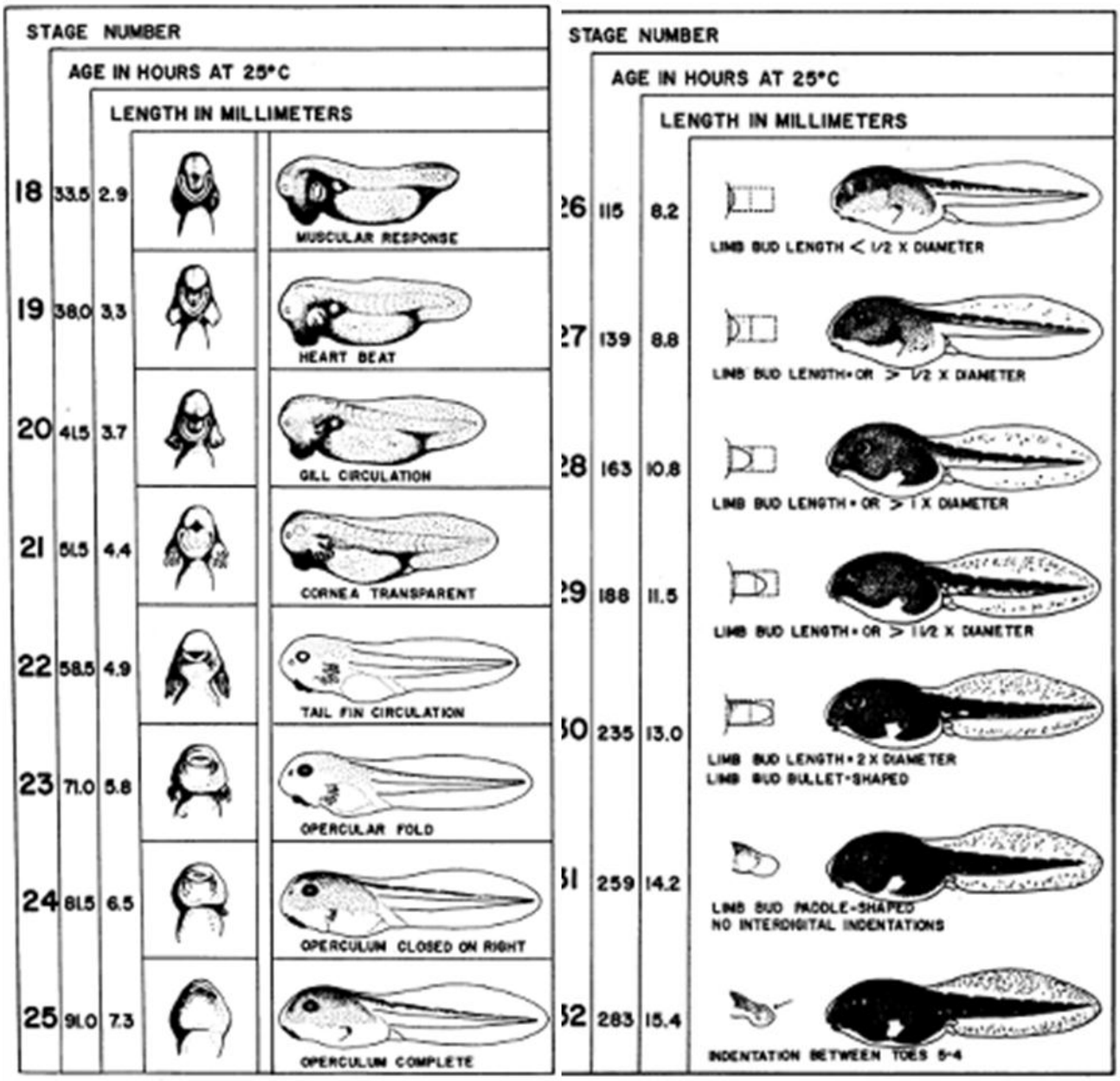
Stage	Oocyte diameter (μm)	Cytological characteristics
1	50–300	The cytoplasm is translucent with absence of yolk platelets. The GV is centrally located and contains nucleoli. (Fig. 1B,C).
2	300–450	The cytoplasm is white translucent, due to the formation of yolk platelets. In the GV, lampbrush chromosomes are visible and numerous nucleoli are present, located mainly in the periphery (Fig. 1C,D).
3	450–600	The oocyte is opaque and slightly pigmented (white oocytes in Fig. 1A). Yolk platelets are larger. The centrally located nucleus contains nucleoli distributed mostly in the nuclear periphery. Vascularization is visible around oocytes.
4	600–1000	Dark pigment occurs in the entire oocyte, with a higher concentration in the animal pole. Yolk platelets are more abundant and larger. The GV is slightly displaced towards the animal region. Numerous nucleoli are located in the nuclear periphery. Vascularization is visible around oocytes.
5	1000–1200	Animal and vegetal poles of the oocyte are clearly visible, with a higher concentration of dark pigment in the animal pole. Yolk platelets are more abundant and larger. The GV is displaced towards the animal region. Numerous nucleoli are located in the nuclear periphery. GVBD was not determined. Vascularization is visible around the oocytes.
6	1200–1400	Animal and vegetal poles of the oocyte are clearly visible, with a higher concentration of dark pigment in animal pole (full grown oocyte in Fig. 1A). The equatorial band of pigment could not be distinguished from the slightly pigmented vegetal region. Vascularization was visible around oocytes. GVBD and the histology were not analyzed in oocytes of this stage.

[1]Stages of oogenesis were defined according to *Xenopus laevis* (Dumont 1972). GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown.

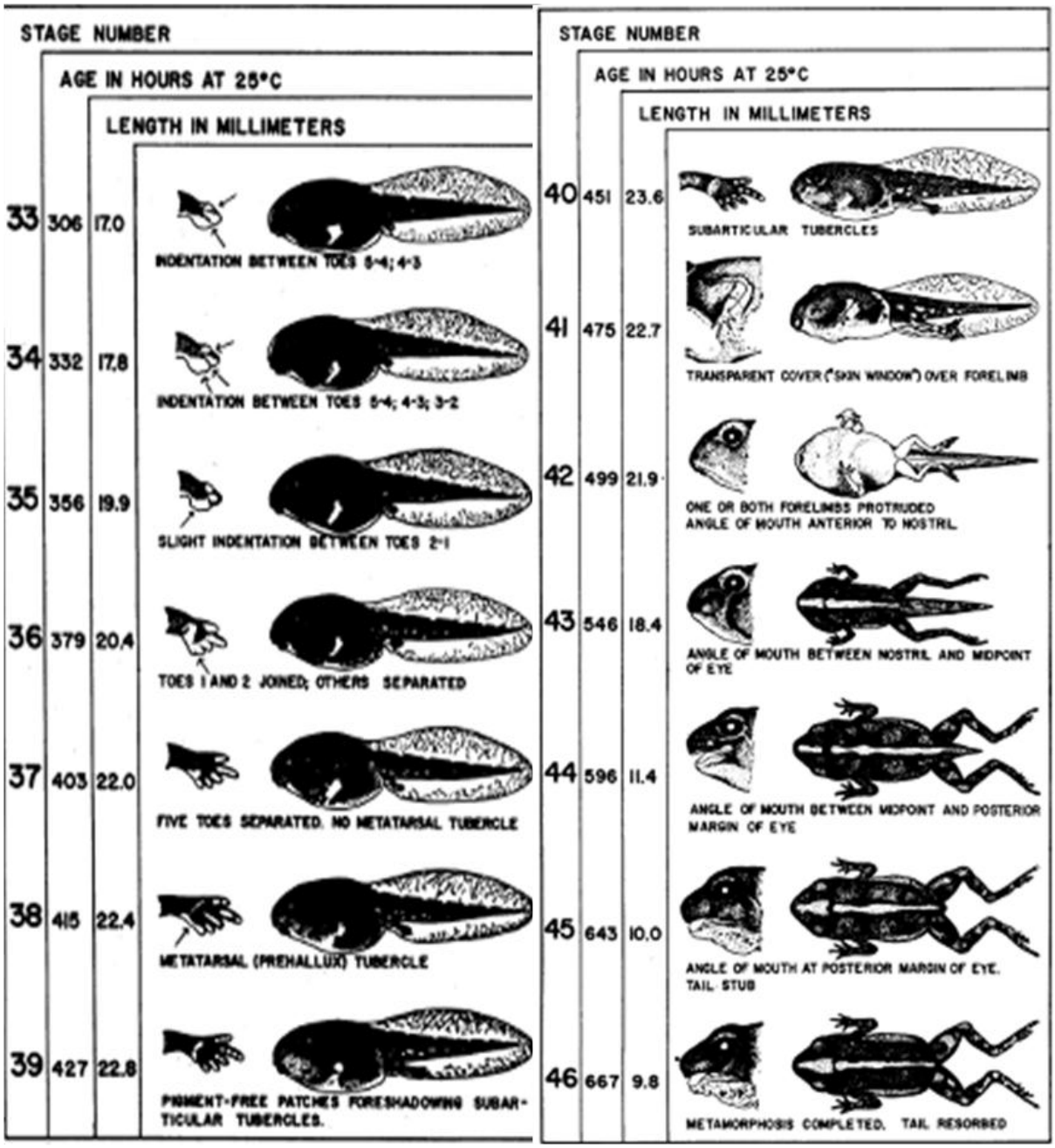
Anexo 4. Desarrollo normal de *Bufo valliceps* (Limbaugh y Volpe, 1957)



Anexo 4. (Continuación) Desarrollo normal de *Bufo valliceps* (Limbaugh y Volpe, 1957)



Anexo 4. (Continuación) Desarrollo normal de *Bufo valliceps* (Limbaugh y Volpe, 1957)



PARA GRADOS ACADÉMICOS DE LICENCIADOS (TERCER NIVEL)

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Gabriela Elizabeth Bautista Toapanta, C.I. 171885403-5, autora del trabajo de graduación titulado: "Fertilización in vitro, morfología parcial externa de embriones y larvas de *Rhinella marina* (Anura: Bufonidae) y ovulación en *Chiasmocleis bassleri* (Anura: Microhylidae)", previa a 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 la 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, 4 de Diciembre del 2012

Srta. Gabriela Elizabeth Bautista Toapanta
C.1.: 171885403-5