

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Patrón de pigmentación de embriones de dos especies de dendrobatidos:**

*Epipedobates anthonyi e Hyloxalus elachyhistus.*

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Maura Alejandra Almeida Andrade

Quito, 2023

**Certificación de la finalización de la disertación concedida por el director**

Dr. Andrés Romero Carvajal

A mis padres por apoyarme en mis sueños.

A mis hermanos por acompañarme y apoyarme.

A mis amigos y familia por siempre estar.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco atentamente a la Balsa de los sapos especialmente a Andrés Merino, Freddy Almeida, Xavier Rosero y Flor Rosero por ser parte fundamental de la estructuración de este trabajo. Por proveer los elementos necesarios para sentar las bases de esta investigación y por su apoyo y guía en el cuidado de las ranas. A voluntarios y becarios de la balsa por apoyarme en el cuidado y alimentación de las ranas.

Al museo de herpetología por brindar espacio para poder capturar las fotografías que son parte de este trabajo. Por su guía y acompañamiento, gracias.

Agradezco al laboratorio 116 de Biología del Desarrollo por el apoyo y recomendaciones brindadas a lo largo de la realización de protocolos y uso de material dentro del laboratorio.

Por último, reconozco el valor y el esfuerzo de Andrés Romero como director y guía en este trabajo de titulación, por su acompañamiento y dirección a lo largo de estos meses de investigación. Sin su paciencia y entrega no hubiera sido posible.

## TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN .....	8
2. OBJETIVOS .....	11
2.1 General .....	11
2.2 Específicos .....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
3.1 Obtención de embriones y renacuajos .....	12
3.1.1 Obtención de objeto de estudio 1 ( <i>Hyloxalus elachyhistus</i> ) .....	12
3.1.2 Obtención de objeto de estudio 2 ( <i>Epipedobates anthonyi</i> ) .....	12
3.1.3 Crianza de morfotipos.....	13
3.2 Fijación de embriones y almacenamiento.....	13
3.3.1 Anestesia de embriones.....	13
3.3.2 Anestesia de renacuajos.....	14
4. RESULTADOS.....	14
4.1 Desarrollo de pigmentación en morfotipos de <i>Epipedobates anthonyi</i> .....	14
4.2 Desarrollo de la pigmentación en <i>Hyloxalus elachyhistus</i> .....	16
4.3 Desarrollo del patrón de pigmentación en metamorfos con cola de <i>E. anthonyi</i> y <i>H. elachyhistus</i> .....	17
4.4 Desarrollo del patrón de pigmentación en embriones de <i>E. anthonyi</i> y <i>H. elachyhistus</i> ....	17
5. DISCUSIÓN .....	18
6.Referencias Bibliográficas .....	25
7.ANEXOS .....	30

## Tabla de figuras

<b>Figura 1.</b> Comparación de la variación de patrones de pigmentación en morfotipos de <i>Epipedobates anthonyi</i> .....	30
<b>Figura 2.</b> Desarrollo del desarrollo de patrones de pigmentación de morfotipos de <i>Epipedobates anthonyi</i> .....	31
<b>Figura 3.</b> Desarrollo del patrón de pigmentación de <i>Hyloxalus elachyhistus</i> .....	31
<b>Figura 4.</b> Comparación de desarrollo de patrón de pigmentación en metamorfos con cola de <i>E.anthnoyi</i> y <i>H .elachyhistus</i> .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Figura 5.</b> Comparación de células iridiscentes y auto fluorescentes de <i>E. anthonyi</i> y <i>H. elachyhistus</i> en estadio 25.....	31
<b>Figura 6.</b> Estructuras auto fluorescentes en otros estadiós de <i>E. anthonyi</i> ..	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Figura 7</b> Estructuras auto fluorescentes en otros estadiós de <i>H. elachyhistus</i> ..	31

## RESUMEN

La familia Dendrobatidae pertenece al Orden Anura, representa un grupo de anfibios caracterizados por tener una distribución tropical, con un importante número de especies en Centroamérica y Sudamérica. Los dendrobátidos poseen características dérmicas importantes, pues son anfibios que tienen propiedades ecológicas referentes a su patrón de pigmentación, de acuerdo a esto se puede distinguir dos tipos, una pigmentación aposemática o criptica. En el presente estudio se analizó la piel de dos especies de Dendrobatidos: *Epipedobates anthonyi* e *Hyloxalus elachyhistus*. Se determinaron las características de la piel de ambas especies en estado embrionario, larvario y post-metamórfico. Se determinó que *E.anthnoyi* posee patrones de pigmentación polimórficos y se establecieron las diferencias en el desarrollo de estos patrones de. Se determinó que *H. elachyhistus* y *E.anthnoyi* poseen el mismo patrón de desarrollo en estado embrionario y comienzan a verse diferencias cuando comienza la etapa juvenil (post-metamorfosis). Por esto el patrón de pigmentación en estado embrionario construye las bases celulares para que después la reorganización de ellas detalle las características de la piel. Se determinaron también las relaciones que tienen estos patrones de pigmentación con la ecología y evolución de estas especies.

## 1. INTRODUCCIÓN

La familia Dendrobatidae pertenece al Orden Anura, representa un grupo de anfibios caracterizados por tener una distribución tropical, con un importante número de especies en Centroamérica y Sudamérica (Guillory et al., 2019). De acuerdo con la revisión sistemática de Grant y sus colaboradores en el 2006, la familia Dendrobatidae se caracteriza por poseer hábitos diurnos y elaborados comportamientos reproductivos, en el que se destacan el cuidado parental y el transporte de renacuajos (Grant et al., 2006).

Los dendrobatidos poseen especies catalogadas como venenosas, la nocividad se debe a la obtención de toxinas a partir de una dieta rica en artrópodos pequeños (Posso-Terranova y Andrés, 2017). Debido a sus inusuales patrones de coloración y sus pigmentos distintivos, las ranas venenosas del neotrópico son el claro y más representativo ejemplo de mecanismos aposemáticos como estrategia para evitar la depredación (Wang y Shaffer, 2008). El estudio de dendrobátidos es relevante en el ámbito evolutivo debido a el amplio interés en entender los mecanismos genéticos y filogenéticos de las toxinas que poseen (Posso-Terranova y Andrés, 2017).

La relación entre la presencia o ausencia de toxinas y coloración aposemática representa un campo de estudio con varias incógnitas, sin embargo, se sabe que existe una influencia de los patrones de pigmentación con la expresión génica, que es lo que define el matiz, el color y la reflectividad del tejido dermal (Posso-Terranova y Andrés, 2017), es importante mencionar que existe evidencia de que la coloración de los dendrobatidos también tiene un función de camuflaje (Barnett et al., 2018) lo que explicaría la función de los patrones de pigmentación en ausencia de

toxinas. Las diferencias entre patrones se pueden observar en distintas especies y géneros de la familia, algunos estudios evidencian la importancia de las señales visuales para el aislamiento reproductivo (Brusa et al., 2012), por lo que el estudio de los patrones de pigmentación sugiere una vía genética representativa para el estudio filogenético de la familia Dendrobatidae.

La arquitectura o arreglo de los pigmentos está influenciada por factores genéticos que se dan como resultado de presiones selectivas y evolutivas (Rodríguez et al., 2020) los colores se dan gracias a la disposición de algunos pigmentos que son absorbidos por distintas longitudes de onda, y otros que se dan como resultado de reflectividad (Shawkey y D'Alba, 2017). En dendrobatidos la coloración está influenciada por los cromatóforos, células que se originan en la cresta neural y se clasifican en tres tipos: los xantóforos, iridóforos y melanóforos (Pizano, 2020). Los melanóforos sintetizan los pigmentos oscuros, los xantóforos expresan colores que se encuentran en un espectro desde el amarillo al rojo; y por último los iridóforos, son células que producen reflectividad que resulta en una coloración estructural verde o azul (Rodríguez et al., 2020). Los patrones de pigmentación son el resultado de la distribución espacial y la densidad de la agregación de células de pigmento (Liang et al., 2020). Pese a las nociones de la influencia de la arquitectura celular en patrones de pigmentación, el estudio de las células de pigmento aún permanece poco estudiado.

La familia cuenta con 285 especies (Guillory et al., 2019) de las cuales 48 se encuentran en Ecuador y de estas, 34 son endémicas (Ron, Merino y Ortiz, 2021), las cifras proponen una presencia importante de dendrobatidos en Ecuador, por lo tanto, el estudio de dendrobatidos distribuidos en Ecuador representa un nicho de estudio creciente y abre una puerta hacia la ampliación del conocimiento de esta singular familia. Una de las especies presentes en el país es *Epipedobates anthonyi*, es una especie distribuida en el suroeste de Ecuador, esta especie de

pequeñas dimensiones; puede medir hasta 3 cm (Coloma, Frenkel y Ron, 2018). Su coloración está caracterizada por la presencia de una línea lateral completa, la coloración de los adultos varía entre poblaciones, sin embargo, en general poseen líneas longitudinales claras que se disponen sobre un cuerpo predominantemente oscuro que va desde colores rojizos a cafés (Coloma, Frenkel y Ron, 2018).

*Epipedobates anthonyi* al igual que varias especies de esta familia que son aposemáticas, es una especie de anuro polimórfico (Tarvin et al., 2017). Es decir, la misma especie tiene distintos fenotipos. Los distintos morfotipos se encuentran distribuidos en poblaciones de los Andes del Ecuador que varían de acuerdo a un rango de elevación, esta variación fenotípica resulta en 4 morfotipos que se caracterizan por tener pigmentación de tonalidades rojas a marrones; que forman un patrón con colores que van desde el verde hasta el azul turquesa (Páez, Trumbo y Funk, 2021). Artículos explican los procesos de especiación gracias a la variación genotípica dentro de las poblaciones de una especie, sin embargo, se ha demostrado que la variación fenotípica puede representar un eslabón importante en el entendimiento del aislamiento de poblaciones debido a diferencias ecológicas (Tarvin et al., 2017; Páez, Trumbo y Funk, 2021). El entendimiento del cambio de las poblaciones de especies aposemáticas polimórficas en ámbitos morfológicos y ecológicos se encuentra todavía poco explorado y la ausencia de información representa una barrera importante en el entendimiento taxonómico de especies de Anuros (Tarvin et al, 2017).

Otros dendrobatidos poseen especies con patrones de coloración inconspicua, (Páez, Coloma y Santos, 2010). *Hyloxalus elachyhistus* pertenece a un género caracterizado por una diversificación de ranas con pigmentación críptica en los Andes (Páez, Coloma y Santos, 2010). *Hyloxalus elachyhistus* está distribuida en las estribaciones de la cordillera de los andes y en la cordillera occidental en altitudes desde 710 a 2760 m.s.n.m (Koch., Venegas, & Rödder, 2011).

Los individuos poseen una coloración amarillo-grisácea o negruzca, poseen una línea oblicua lateral que se entiende desde la parte posterior hacia el ojo (Coloma, Ortiz y Frenkel, 2018). Las diferencias significativas entre *Epipedobates anthonyi* y *Hyloxalus elachyhistus* están en la disposición de sus colores y el patrón de pigmentación de su piel.

Los mecanismos de convergencia de color y las presiones selectivas que promueven el apareamiento de distintos patrones en una misma especie aún permanecen poco estudiados, así como los patrones de pigmentación en especies de dendrobatidos (Twomey, 2020). La base genética, el desarrollo y la evolución de la coloración en Anuros permanece poco estudiada, sobre todo en la etapa larval y embrionaria, no se conoce mucho debido a que la utilidad y a la formación del pigmento parece ausente (Vieira et al., 2022). Sin embargo, el conocimiento del desarrollo de los patrones de pigmentación podría ayudar a comprender acerca de la utilidad ecológica de la pigmentación en etapas tempranas de desarrollo.

En el presente estudio se determinará cómo se desarrolla patrón de pigmentación y las diferencias de coloración entre *Hyloxalus elachyhistus* y *Epipedobates anthonyi*. Desde etapas embrionarias hasta la adultez de los individuos. Estudiando la utilidad de cada una de las células de pigmento que conforman los patrones.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 General**

Determinar los patrones de desarrollo embrionario y larval de la pigmentación de la piel de dos especies de Dendrobatidos: *Epipedobates anthonyi* e *Hyloxalus elachyhistus*.

## **2.2 Específicos**

- Determinar patrones de desarrollo de la pigmentación de la piel de *Epipedobates anthonyi* e *Hyloxalus elachyhistus* mediante la observación de los cromatóforos.
- Identificar la disposición de los cromatóforos (xantóforos, iridióforos y melanóforos) en distintos estadios del desarrollo embrionario y larval de cada una de las especies.
- Identificar las diferencias entre los patrones de desarrollo de la pigmentación de la piel de ambas especies.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 Obtención de embriones y renacuajos**

#### **3.1.1 Obtención de objeto de estudio 1 (*Hyloxalus elachyhistus*).**

Los embriones de la especie dendrobatidos: *Hyloxalus elachyhistus*, serán proporcionados por la “Balsa de los sapos”, iniciativa de conservación y reproducción de anfibios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Los embriones son colectados de los terrarios en estadios iniciales (estadio 8-12) y almacenados en el laboratorio de biología de desarrollo. De igual manera los renacuajos fueron obtenidos de la Balsa de los sapos.

#### **3.1.2 Obtención de objeto de estudio 2 (*Epipedobates anthonyi*).**

Se obtuvieron huevos de 4 morfotipos de *Epipedobates anthonyi*, los morfotipos fueron catalogados de acuerdo el lugar de colección y la base de datos de la balsa de los sapos. A excepción del morfotipos 2, cuyas crías fueron el resultado del cruce de ranas de coloración

amarilla y rojiza (Morfo 2) y ranas cafés con verdes-turquesa (Morfo 3). Los huevos fueron colectados de cinco terrarios y almacenados en la balsa para documentar su crecimiento. Se obtuvieron embriones desde estadios tempranos para almacenarlos en el laboratorio de biología de desarrollo. De igual manera los renacuajos fueron proporcionados por la balsa de los sapos.

### **3.1.3 Crianza de morfotipos**

Los 4 morfotipos fueron criados desde embriones, al eclosionar estos fueron colocados en acuarios en una sala caliente donde la temperatura es controlada en 27°C, fueron alimentados con moringa y taraxaco. Cuando los renacuajos tenían dos patas se los pasaba a tarrinas de metamorfosis con la misma alimentación. Al momento en el que tenían 4 patas y carecían de cola, eran transportados a tarrinas de metamorfos, aquí se los alimentaba con colémbolos hasta que alcanzaban un crecimiento para alimentarse con grillos pequeños.

Al momento en el que las ranas alcanzaban la adultez se las transportó a terrarios más grandes con flujo de agua continuo o una lluvia simulada, esto con el fin de que continúen de manera adecuada su crecimiento y desarrollen comportamientos reproductivos.

### **3.2 Fijación de embriones y almacenamiento.**

Cuando los embriones alcancen estadios cercanos a la eclosión (23-25) se fijarán en tubos previamente auto clavados en los cuales se colocará 1ml de formaldehído 4% PBS 10x o PFA 4%. Los embriones serán almacenados en refrigeración a 4°C, los que se usarán en el microscopio de fluorescencia serán cubiertos con papel aluminio.

### **3.3 Anestesia de embriones y renacuajos**

### **3.3.1 Anestesia de embriones**

Para fotos observación de fluorescencia y patrón de pigmentación se usaron embriones vivos, esto con el fin de observar los cromatóforos distribuidos de manera natural, y evitar que haya un sesgo por el efecto del fijativo. Los embriones fueron anestesiados con MS222 4g/l, colocados en una solución de Steinberg 10x para simular las condiciones del huevo y evitar que mueran por estrés, fueron retirados del huevo con dos pinzas y después con una pipeta colocados cuidadosamente en 100 µl de MS222 durante 5 minutos, para observación de auto fluorescencia se usó hielo para mantener el efecto de anestesia más tiempo.

### **3.3.2 Anestesia de renacuajos**

Los renacuajos fueron anestesiados con 300 µl de MS222 en una cantidad de agua destilada que cubría sólo las patas.

## **4. RESULTADOS.**

### **4.1 Desarrollo de pigmentación en morfotipos de *Epipedobates anthonyi***

Existen 4 morfotipos registrados en la Balsa de los sapos, estos poseen características distintivas en cuanto a distribución y tono de los pigmentos. El morfotipo 1 (Fig. 1A) posee 3 líneas de melanóforos bien definidas y una coloración verde. El morfotipo (Fig. 1B) tiene predominancia del color amarillo y líneas cafés claras, existen individuos que no poseen las distintivas franjas de la especie (Fig. 1C). El morfotipo 3 (Fig. 1D) posee predominancia del color café oscuro y las franjas verdes se disponen en la parte dorsal de forma paralela, la línea de la mitad es entrecortada. Por último, el morfotipo 4 (Fig. 1E) posee una coloración café-rojiza con franjas turquesas delgadas que se disponen de forma paralela al cuerpo de la rana.

Se registró el desarrollo del patrón de pigmentación desde las etapas de metamorfos (absorción completa de la cola ) hasta la adultez. Después de la absorción completa de la cola los metamorfos fueron transportados a tarrinas en las cuales existía su fecha de transporte como referencia, de esta manera se registraban los cambios en el patrón y en la pigmentación, en la Figura 2 se muestran el desarrollo y los cambios en el patrón de desarrollo en el primer, tercer, sexto y octavo mes. Se tomó de referencia estos tiempos debido a que se encontraron cambios más significativos.

Al hacer una observación del desarrollo de la pigmentación de los individuos de cada morfotipo (Fig. 2) se determinó que, durante el primer mes de desarrollo, el patrón de pigmentación no cambia de manera considerable entre morfotipos, existe una predominancia del color verde-amarillento en los primeros días de metamorfos. Se mantiene el mismo patrón que son las franjas cafés distribuidas de manera antero-posterior delimitando las franjas donde se disponen los colores verde-amarillentos. En el primer mes, los colores se mantienen en los mismos tonos en los 4 morfotipos.

Al tercer mes se comienzan a observar diferencias en la distribución de pigmentos y es posible determinar si van a predominar las franjas cafés o las franjas verdes y también se observa un cambio en los tonos verdes y cafés. Se distinguen diferencias entre la dominancia de ciertos pigmentos sobre todo en el morfotipo 3 (Fig. 2. D2).

El morfotipo 1 desarrolla pigmentación verde y café, los patrones de pigmentación permanecen distribuidos de manera equitativa en la piel, es decir las franjas cafés y verdes son casi de la misma extensión. A los 8 meses (Fig. 2. A4) se comienza a notar que las franjas cafés se extienden a la parte anterior del cuerpo de la rana. Debido a que solo existen hembras del morfotipo2 en la Balsa de los sapos, estas fueron cruzadas con el morfotipo 4. Se observó que a

pesar de que la mayoría de la población se asemeja al resto de morfotipos en los primeros meses. Existen individuos en los que hay dominancia del color amarillo (Fig. 2.B) con franjas tenues cafés y otra parte que posee colores azul-verdosos y cafés (Fig. 2.C) .

El morfotipo 3 (Fig. 2D) posee un pigmento café más oscuro y se comienzan a distinguir franjas de este color bien definidas y más anchas, el color verde se mantiene en franjas delgadas entre los colores cafés. Por último, el morfotipo 4 (Fig. 2E) al sexto mes comienza a tener líneas ligeramente más estrechas, sin embargo, no es hasta el octavo mes que comienzan a notarse tonos más turqueses y líneas más estrechas lo que genera una predominancia del color café en la rana.

#### **4.2 Desarrollo de la pigmentación en *Hyloxalus elachyhistus***

Al igual que en *Epipedobates anthonyi*, se registró el desarrollo del patrón de pigmentación en el primer, tercer, sexto y octavo mes (Fig. 3). Los metamorfos de esta especie presentan iridiscencia roja en los primeros meses de crecimiento, también tienen dos franjas de iridóforos bien definidas a los lados del cuerpo (Fig. 3A). Al tercer mes (Fig. 3B) se puede observar una iridiscencia roja en donde se disponen melanóforos, es decir sitios con pigmentación café con un patrón indefinido. Es importante destacar que en los primeros meses de desarrollo las patas poseen un color amarillo el cual se va oscureciendo a medida que los melanóforos se esparcen por todo el cuerpo. Los melanóforos se agrupan desde las partes laterales hacia el centro de las patas que son rojas en la base. La iridiscencia provoca tonos verdes en la parte dorsal pero también hay una reflectancia roja.

La iridiscencia roja se pierde a medida que avanza la predominancia de tonos cafés en la piel, cuando la rana (octavo mes) tiene el cuerpo completamente oscuro no se nota iridiscencia a excepción de las franjas de los lados que presentan tonos amarillentos. La piel de esta especie también presenta mayor rugosidad y textura.

#### **4.3 Desarrollo del patrón de pigmentación en metamorfos con cola de *E. anthonyi* y *H. elachyhistus*.**

En el estado larvario se comienza a observar una agrupación de cromatóforos lo que forma un patrón visible. Los iridóforos se mantienen en grupos a lo largo del dorso, estas agrupaciones circulares aumentan su tamaño hasta formar franjas, en el caso de *Epipedobates anthonyi* (Fig. 4. A) las franjas laterales se forman primero y la línea intermedia se forma a medida que la cola se absorbe. Las líneas laterales se ven mejor definidas debido a que es un lugar libre de melanóforos, en estos lugares se logra apreciar mejor la iridiscencia de los iridóforos. Por otro lado, *elachyhistus* tiene agrupaciones circulares en el dorso, se comienza a ver agrupaciones más unidas desde la parte posterior, desde las patas traseras hacia la parte anterior.

#### **4.4 Desarrollo del patrón de pigmentación en embriones de *E. anthonyi* y *H. elachyhistus*.**

Se comparó la iridiscencia y la auto fluorescencia con el fin de determinar el desarrollo del patrón de pigmentación en etapa embrionaria. Las células se pueden terminar gracias a la luz transmitida y reflejada. El patrón de iridóforos fue determinado por luz transmitida, colocando la luz encima de la muestra. En la figura 5 se puede observar una comparación de estructuras fluorescentes e iridiscentes entre *H. elachyhistus* y *E. anthonyi* a estadio 25. Las células autofluorescentes son xantóforos y estos se distribuyen a lo largo de todo el cuerpo del embrión. Si se usa luz transmitida desde arriba se aprecian los iridóforos con la misma distribución. Al hacer una superposición de ambas células (Fig. 5 C,H) se determinó que poseen la misma distribución con ciertas variaciones en forma. Las células auto fluorescentes poseen ramificaciones y son más irregulares, mientras que las células iridiscentes son más circulares y poseen una especie de gránulos brillantes que generan tonos amarillos. A simple vista no se distinguen tantas diferencias entre una especie y otra, sin embargo, cuando se hace la superposición de ambas fotografías se logra ver que en *H.*

*elachyhistus* hay una mayor concentración de melanóforos entre los espacios con iridóforos y xantóforos. Se puede ver también la distribución de los cromatóforos en el ojo de ambas especies (Fig. 5.D, I) en ambas especies la distribución de xantóforos e iridóforos alrededor de la pupila, las células de pigmento se distribuyen de manera alargada formando un círculo cercano a la pupila. Por último, la cola (Fig. 5 . E, J) en ambas especies se notan células brillantes a lo largo de la cola, hay una acumulación de ellas en la parte dorsal de la cola y estas van.

## 5. DISCUSIÓN

En anuros se conocen tres tipos de células de pigmento o cromatóforos que forman patrones de pigmentación .Los melanóforos, células que contienen pigmentos oscuros como la melanina y esto da como resultado la pigmentación oscura en la piel de las ranas (Meuche, 2009). Los xantóforos son células de pigmento que interactúan con moléculas como los carotenoides (rojo ) o pteridinas (amarillo) (Nilsson , Aspengren y Wallin,2013). Por último, los iridiofaros, células reflectivas que poseen cristales que reflejan la luz transmitida para y por la cual la piel posee tonalidades que van desde el verde hasta el amarillo, también aporta brillantez a la piel (Pizano, 2020). La agregación y distribución de estas células forman la arquitectura de la piel de los anuros.

Las cromatóforos migran desde la cresta neural durante el desarrollo embrionario en anfibios, la migración desde el dorso del embrión a distintos lugares crea patrones de pigmentación específicos y se conoce sobre todo en salamandras que la presencia de regiones libres de melanóforos crea patrones con franjas (Parichy,1996), La migración de los melanóforos es ventral entre la somita y el tubo neural, eventualmente alcanzan la dermis (Tucker, 1986), los xantóforos y iridóforos usan una vía similar, sin embargo, en algunos casos usan una vía dorsolateral (Theveneau y Mayor, 2012). Los embriones fueron estudiados desde el estadio 23, en este

momento se pudo determinar que los melanóforos y los xantóforos habían alcanzado la dermis (Fig. 6 A, B y 7 A, B) ya que se notan células oscuras y fluorescentes juntas, por lo que demuestra que en estadio 23 ya hay una diferenciación clara de las células de pigmento, en este momento se logra distinguir como en las zonas libres de melanóforos se distribuyen los xantóforos, en estadio 23 hay una acumulación de células de pigmento en la parte dorsal del embrión, y en la cabeza las células no poseen ramificaciones como se logra distinguir en estadio 24 y 25. (Fig. 6 y 7 C) También se observó que en *E. anthonyi* las ramificaciones de las células de pigmento del ojo son más alargadas lo que propone una diferencia en el desarrollo del patrón de pigmentación del ojo.

Cuando los embriones están en estadio 25 se logra determinar un patrón de pigmentación con luz transmitida, aquí se ve claramente la distribución de los iridóforos en la piel, al observar el patrón de pigmentación se determinó que tienen una distribución similar a la de los xantóforos cuando se los ve en el microscopio de fluorescencia. Al ver la misma sección se logró determinar que tienen la misma distribución, los iridóforos poseen gránulos amarillos y los xantóforos tienen ramificaciones. Esto supone una función conjunta para el desarrollo de pigmentación en ambas especies. Las diferentes tonalidades de pigmentos verdes y amarillos se dan por el arreglo y concentración de plaquetas de guanina de los iridóforos (Kobelt & Linsenmair, 1986) y los carotenos o pteridinas sintetizados en los xantóforos. Las capacidades auto fluorescentes se extienden en algunos organismos del reino animal y dependen de la presencia natural de biomoléculas con sustancias químicas que permiten que las células se vean en un espectro diferente, en reptiles y anfibios se ha demostrado que los colores de fluorescencia se exhiben bajo distintos mecanismos aún poco estudiados (Croce, 2021). Sin embargo, se conoce que los anfibios dos vías de fluorescencia en anfibios, la inherente de los huesos y la otra es gracias a biomoléculas que circulan en el sistema linfático, se ha demostrado que la fluorescencia está ligada a los

pigmentos contenidos en los xantóforos, esto se ha estudiado de manera más detallada en salamandras (Parichy, 1996).

El arreglo de los iridóforos en la piel es disperso, hasta que los embriones eclosionan y comienzan sus metamorfosis, los iridóforos se agrupan y están intercalados con grupos de melanóforos (Fig.4). En *Epipedobates anthonyi* las líneas laterales de iridóforos se forman primero, las franjas intermedias se forman cuando la cola ya está absorbida casi por completo. Esta agregación de células de pigmento crea un pre-patrón de pigmentación, la agregación de células se da de varias maneras. Una es la expresión de moléculas de adhesión celular, los cromatóforos expresan distintas moléculas de adhesión lo que genera una segregación visible de las células de pigmento; también los gradientes de concentración de ciertas vías de señalización (Parichy, 1996b). Hasta este punto del desarrollo de *E. anthonyi* y *H. elachyhistus* no se pueden definir diferencias morfológicas representativas entre el desarrollo temprano de una pigmentación críptica y aposemática. Sin embargo, es importante que después de comprender el rol de cada uno de los cromatóforos y la formación de pre-patrones de pigmentación en estado larvario; se pueda definir las diferencias que existen a una escala genética.

La gran diversidad de patrones de pigmentación y la relación que tienen estos con la ecología de las especies de Dendrobatidos resulta un campo importante de estudio, pues ayuda a definir mejor los procesos micro evolutivos que conducen a la especiación y por ende a la diversidad (Hoffman y Blouin, 2000). El tener una vista más general de las utilidades y funciones de una pigmentación aposemática o críptica, incluye en la discusión y en la explicación del desarrollo de distintos patrones de pigmentación a comportamientos ecológicos importantes como la búsqueda de pareja, especialización de dieta y adaptación a microclimas (Santos y Cannatella, 2011; Stuckert

et al., 2019); esto, sin excluir la importancia que el criticismo y el aposematismo tienen como adaptación para evitar la depredación.

La familia Dendrobatidae posee ranas con coloraciones conspicuas, es decir, poseen pigmentos y patrones que son llamativos; en general, se describen como estrategias de advertencia y mecanismos de defensa contra depredadores (Santos y Cannatella, 2011). *Epipedobates anthonyi* es una especie aposemática polimórfica como se mencionó anteriormente, los estudios de las bases genéticas y la formación o la presencia de morfotipos o fenotipos en una población son importantes para entender las fuerzas microevolutivas que dan origen a variación genética en la naturaleza (Hoffman y Blouin, 2000). Se ha observado que la variabilidad cromática dentro del orden Anura es común, sobre todo si esto representa un aumento en la probabilidad de supervivencia en ambientes donde existen distintos depredadores (Viera et al. , 2022; Bourke, Busse y Bakker, 2011). A pesar de que la memoria de un solo patrón podría favorecer la supervivencia de una especie, la existencia de distintos patrones de pigmentación respondería a las necesidades ecológicas que producen las presiones ambientales a las cuales se tiene que adaptar una especie (Páez, Trumbo y Funk, 2021).

Las poblaciones de *Epipedobates anthonyi* tienen una distribución en un gradiente altitudinal que va desde 0-1800 m.s.n.m, en el estudio de Páez y colaboradores se describen 4 morfotipos que están divididos principalmente en dos transectos uno al norte y otro al sur (Páez, Trumbo y Funk, 2021). Los morfotipos poseen similitudes el primer mes de desarrollo post-metamorfosis, sin embargo, después del tercer mes se comienza a notar diferencias claras en el patrón de pigmentación, hay una tendencia clara hacia la formación de una pigmentación más críptica o aposemática.

Los morfotipos con pigmentación más aposemática son el número 2 y 4, debido a su pigmentación roja (Fig. 1.) El morfotipo dos posee una pigmentación predominantemente amarilla, que se comienza a notar desde el tercer mes, los parentales de este morfotipo si tienen pigmentación roja, sin embargo, hasta el octavo mes no se logra diferenciar tonos rojizos, de hecho, predomina el café en los 4 morfotipos. Los pigmentos rojos se obtienen principalmente de la dieta, en *Dendrobatidis* esta es obtenida de insectos que poseen a su vez, dietas ricas en carotenos (Pröhl et al., 2013). El tener una dieta controlada, solamente con grillos que se alimentan de comida balanceada, explica la pérdida de estos tonos y la diferencia en colores a los parentales que sí fueron capturados de su hábitat. Los pigmentos amarillos son fijados por la concentración de caroteno o pterinas. Los morfotipos 1 y 3 en la naturaleza poseen una pigmentación más inconspicua, por la presencia de tonos cafés predominantemente oscuros. Las diferencias entre los patrones de pigmentación de esta especie están determinadas por la localización de sus poblaciones y se ha demostrado que no hay una variación genética considerable entre poblaciones, por lo que la variación fenotípica está determinada fuertemente por las presiones del ambiente en la que se encuentran (Páez, Trumbo y Funk, 2021). Los morfotipos 2 y 3 poseen mayor variación genotípica y se encuentran en elevaciones más altas, y en el desarrollo del patrón de pigmentación post-metamorfosis poseen cambios considerables desde el tercer mes, debido a la predominancia de pigmentos amarillos o cafés; estas dos especies se encuentran geográficamente más aisladas y se ha determinado que existe menor diversidad genética dentro de las poblaciones; lo que podría conducir a estos dos morfotipos a la especiación por poco flujo de genes (Páez, Trumbo y Funk, 2021).

Los colores rojos en el patrón de pigmentación demuestran la presencia de toxinas nocivas, la pigmentación aposemática es favorecida por la ventaja que representa frente a la depredación,

pero las diferencias ecológicas conducen a la existencia de morfotipos que no poseen los pigmentos aposemáticos y permanecen dentro de una población. En la familia Dendrobatidae existen distintas especies con pigmentación aposemática que poseen morfotipos que carecen de pigmento con características aposemáticas, sin embargo se sabe que la bioacumulación de sustancias nocivas por ingesta de artrópodos evolucionó primero, lo que explica como a pesar de no tener los mismos patrones, estas especies mantienen su veneno, los colores de alarma evolucionario después (Santos et al., 2016; Tarvin et al., 2017). El género *Epipedobates* es el clado más joven de Dendrobatidos en desarrollar aposematismo, las señales de alerta debido a toxicidad evolucionan de manera parafilética en el grupo y se pierde en ciertas especies como *E. machalilla*, en el género *Epipedobates* la pigmentación aposemática existe en clados que no son hermanos como *E. anthonyi* y *E. tricolor* (Tarvin et al., 2017). Se puede inferir que en especies aposemáticas, la divergencia genotípica se da como resultado de distintos factores ecológicos, no solo para favorecer la depredación. Es por esto que los patrones de pigmentación no mantienen características o pigmentos brillantes por sobre pigmentos oscuros.

*Hyloxalus elachyhistus* es una especie con pigmentación críptica, su distribución está en altitudes varían entre algunas altitudes (Koch., Venegas, & Rödder, 2011). El cripticismo se ha mantenido de manera convergente en varios géneros de la familia Dendrobatidae, en general se describe como una táctica frente a la depredación, en la que los individuos pueden usar la pigmentación oscura del dorso para mimetizarse (Vences et al., 2003). Los mecanismos de convergencia del cripticismo permanecen poco estudiados, y representan un desafío en la identificación de especies. Pero se conoce que en este género hay especies que también ha evolucionado su dieta para secuestrar toxinas de ellos, y por ende han desarrollado pigmentación aposemática también (Santos y Canatella, 2011).

Las nociones ecológicas que subyacen a los distintos patrones de pigmentación aún permanecen poco estudiadas, pero representan un tema importante para el conocimiento de la diversidad y evolución de anuros. Pese a que ambas especies poseen distintos tipos de pigmentación, los patrones en etapas embrionarias no poseen diferencias representativas y a pesar de generar distintos pigmentos mantienen la auto fluorescencia en etapas tempranas. Los mecanismos de migración de las células no han sido estudiados dentro de estos grupos y representan las primeras diferencias notables en el desarrollo del patrón de pigmentación de *E. anthonyi* y *H. elachyhistus*. En cuestiones ecológicas y evolutivas el desarrollo de patrón de pigmentación en especies polimórficas aposemáticas como *E. anthonyi* representa un nicho de estudio importante pues pese a la gran variación fenotípica se ha demostrado que no tienen gran variación genotípica; las distintas vías de migración de cromatóforos en la piel de dendrobatidos podría contribuir al entendimiento de estas variaciones.

## 6.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barnett, J. B., Michalis, C., Scott-Samuel, N. E., & Cuthill, I. C. (2018). Distance-dependent defensive coloration in the poison frog *Dendrobates tinctorius*, Dendrobatidae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(25), 6416–6421.
- Brusa, O., Bellati, A., Meuche, I., Mundy, N. I., & Pröhl, H. (2012). Divergent evolution in the polymorphic granular poison-dart frog, *Oophaga granulifera*: genetics, coloration, advertisement calls and morphology. *Journal of Biogeography*, 40(2), 394–408.
- Bourke, J., Busse, K. C., & Bakker, T. M. (2011). Sex differences in polymorphic body coloration and dorsal pattern in Darwin's frogs (*Rhinoderma darwinii*). *The Herpetological Journal*, 21(4), 227-234.
- Coloma, L. A., Frenkel, C. y Ron, S. R. 2018. *Epipedobates anthonyi* En: Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (Eds). *Anfibios del Ecuador*. Version 2021.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica de Ecuador. Recuperado de :  
<https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Epipedobates%20anthonyi>,  
acceso jueves, 25 de Noviembre de 2021
- Coloma, L. A., Ortiz, D. A. y Frenkel, C. 2018. *Hyloxalus elachyhistus* En: Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (Eds). *Anfibios del Ecuador*. Version 2021.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.  
<https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Hyloxalus%20elachyhistus>.
- Croce, A. C. (2021). Light and autofluorescence, multitasking features in living organisms. *Photochem*, 1(2), 67-124.

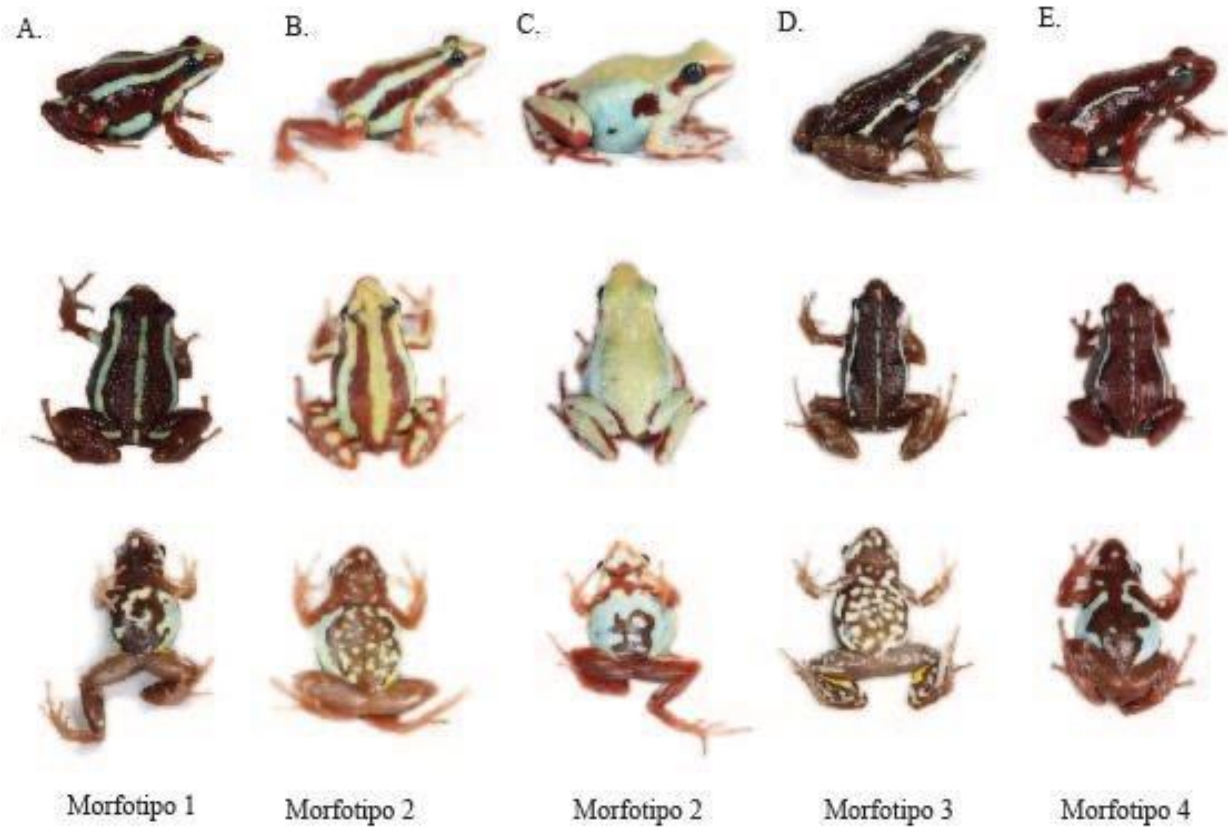
- Grant, T., Frost, D. R., Caldwell, J. P., Gagliardo, R. O. N., Haddad, C. F., Kok, P. J., . & Wheeler, W. C. (2006). Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: *Athesphatanura*: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of natural History*, 2006(299), 1-262.
- Grant, T., Rada, M., Anganoy-Criollo, M., Batista, A., Dias, P. H., Jeckel, A. M., & Rueda-Almonacid, J. V. (2017). Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives revisited (Anura: Dendrobatoidea). *South American Journal of Herpetology*, 12(s1).
- Gagliardo, R., Haddad, C. F., & Kok, P. J. (2006). Phylogenetic Systematics Of Dart-Poison Frogs And Their Relatives (Amphibia: *Athesphatanura*: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of natural History*, 2006(299), 1-262
- Guillory, W. X., Muell, M. R., Summers, K., & Brown, J. L. (2019). Phylogenomic Reconstruction of the Neotropical Poison Frogs (Dendrobatidae) and Their Conservation. *Diversity*, 11 (8),.
- Koch, C., Venegas, P. J., & Rödder, D. (2011). Advertisement call of *Hyloxalus elachyhistus* (Edwards, 1971)(Anura, Dendrobatidae). *Salamandra*, 47(2), 116-119.
- Kobelt, F., & Linsenmair, K. E. (1986). Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment: I. The skin of *Hyperolius viridiflavus nitidulus* in wet and dry season conditions. *Oecologia*, 68, 533-541.
- Liang, Y., Gerwin, J., Meyer, A., & Kratochwil, C. F. (2020). Developmental and Cellular Basis of Vertical Bar Color Patterns in the East African Cichlid Fish *Haplochromis latifasciatus*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 8, 62
- Meuche I. (2009). Changes of individual colour patterns in the Central American strawberry poison frog, *Oophaga pumilio* (Amphibia: Dendrobatidae). *Heredity*, 128(1), 33-44.

- Nilsson Sköld, H., Aspengren, S., & Wallin, M. (2013). Rapid color change in fish and amphibians—function, regulation, and emerging applications. *Pigment cell & melanoma research*, 26(1), 29-38.
- Parichy, D. M. (1996). When Neural Crest and Placodes Collide: Interactions between Melanophores and the Lateral Lines That Generate Stripes in the Salamander *Ambystoma tigrinum* (Ambystomatidae). *Developmental biology*, 175(2), 283-300.
- Parichy D.M (1996b )Salamander pigment patterns: how can they be used to study developmental mechanisms and their evolutionary transformation. *Int. J. Dev, Biol*, 40, 871-884
- Páez-Vacas, M.I., L. A. Coloma & J. C. Santos (2010): Systematics of the *Hyloxalus bocagei* complex (Anura: Dendrobatidae), description of two new cryptic species, and recognition of *H. maculosus*. *Zootaxa*, 2711: 1–75.
- Pizano, R. M. (2020). The Evolutionary, Biogeographic, and Genetic Origin of Color Pattern Diversity in Phyllobates Poison-dart Frogs (Doctoral dissertation, The University of Chicago). Recuperado de :  
<https://www.proquest.com/openview/48f3fdcf8917f2755405f8065f214cdc/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>
- Posso-Terranova, A., & Andrés, J. Á. (2017). Diversification and convergence of aposematic phenotypes: truncated receptors and cellular arrangements mediate rapid evolution of coloration in harlequin poison frogs. *Evolution*, 71(11), 2677-2692.
- Pröhl, H., Eulenburg, J., Meuche, I., & Bolanos, F. (2013). Parasite infection has little effect on sexual signals and reproductive behaviour in strawberry poison frogs. *Evolutionary Ecology*, 27, 675-692.

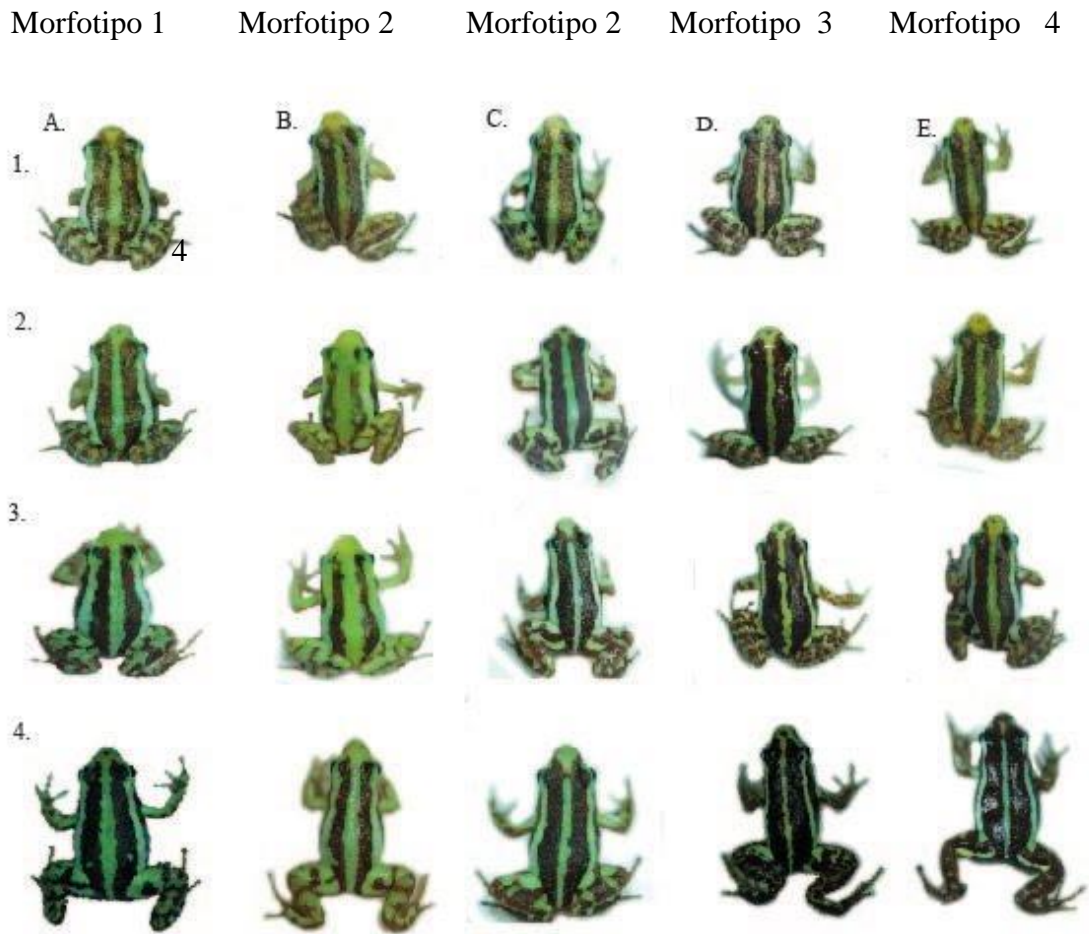
- Shawkey, M. D., & D'Alba, L. (2017). Interactions between colour-producing mechanisms and their effects on the integumentary colour palette. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372 (1724).
- Rodríguez, A., Mundy, N. I., Ibáñez, R., & Pröhl, H. (2020). Being red, blue and green: the genetic basis of coloration differences in the strawberry poison frog (*Oophaga pumilio*). *BMC genomics*, 21(1), 1-16.
- Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. 2021. Anfibios del Ecuador. Version 2021.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado de: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb>>, fecha de acceso 3 de enero, 2021.
- Santos, J. C., & Cannatella, D. C. (2011). Phenotypic integration emerges from aposematism and scale in poison frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(15), 6175–6180.
- Stuckert, A. M., Moore, E., Coyle, K. P., Davison, I., MacManes, M. D., Roberts, R., & Summers, K. (2019). Variation in pigmentation gene expression is associated with distinct aposematic color morphs in the poison frog *Dendrobates auratus*. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 1-15.
- Tarvin, R. D., Powell, E. A., Santos, J. C., Ron, S. R., & Cannatella, D. C. (2017). The birth of aposematism: High phenotypic divergence and low genetic diversity in a young clade of poison frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 109, 283-295.
- Theveneau, E., & Mayor, R. (2012). Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental Biology*, 366(1), 34–54.

- Tucker, R. (1986). The role of glycosaminoglycans in anuran pigment cell migration. *Journal of Embryology and Experimental morphology*, 92 (1): 145–164.
- Twomey, E., Kain, M., Claeys, M., Summers, K., Castroviejo-Fisher, S., & Van Bocxlaer, I. (2020). Mechanisms for color convergence in a mimetic radiation of poison frogs. *The American Naturalist*, 195(5), E132-E149.
- Vences, M., Kosuch, J., Boistel, R., Haddad, C. F., La Marca, E., Lötters, S., & Veith, M. (2003). Convergent evolution of aposematic coloration in Neotropical poison frogs: a molecular phylogenetic perspective. *Organisms Diversity & Evolution*, 3(3), 215-226.
- Vieira, K. S., Oliveira, E. K. S., Vieira, W. L. S., & Alves, R. R. N. (2022). Polymorphism in a Neotropical toad species: ontogenetic, populational and geographic approaches to chromatic variation in *Proceratophrys cristiceps*. *PeerJ*, 10, e12879.
- Wang, I. J., & Shaffer, H. B. (2008). Rapid color evolution in an aposematic species: A phylogenetic analysis of color variation in the strikingly polymorphic strawberry poison-dart frog. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 62(11), 2742-2759.

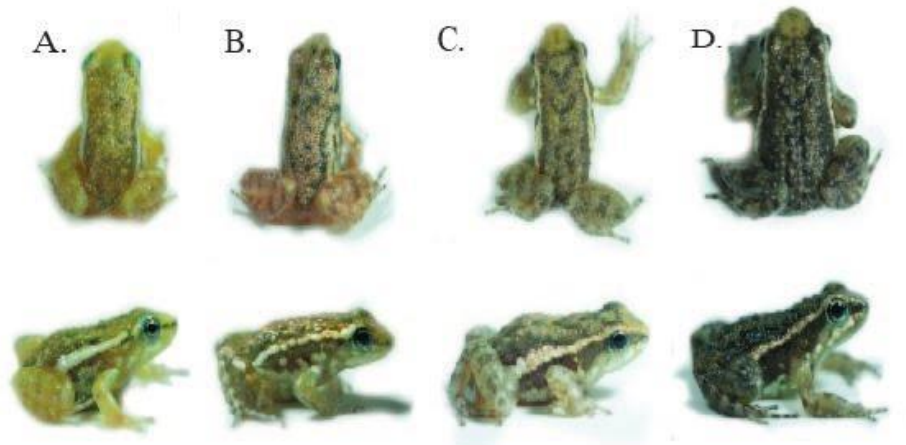
## 7.ANEXOS



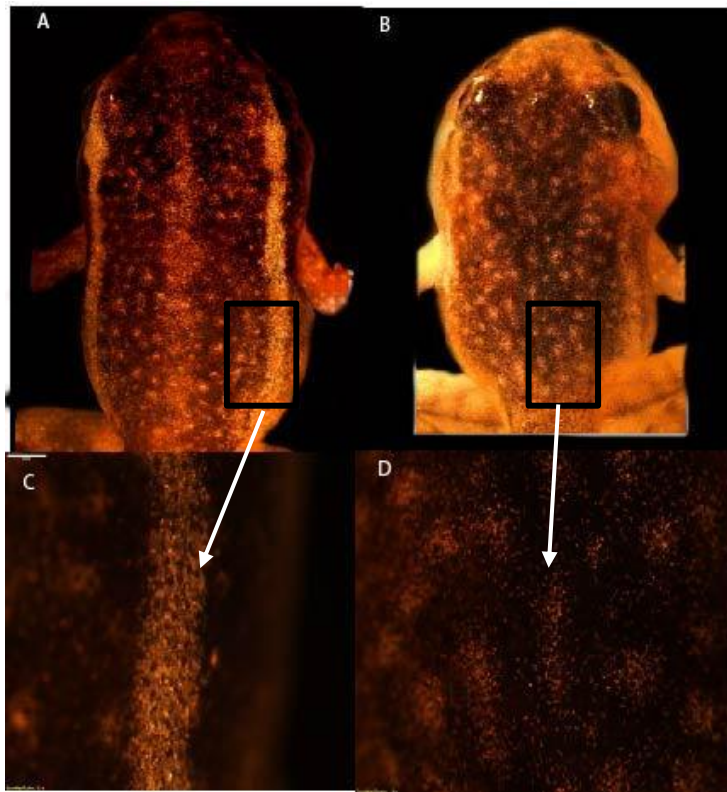
**Figura 1.** Comparación de la variación de patrones de pigmentación en morfotipos de *Epipedobates anthonyi*. (A) Vista Lateral, dorsal y ventral de Morfotipo 1 . (B y C) Vista lateral, dorsal y ventral de dos hembras de morfotipo 2, ambas hembras fueron colectadas en el mismo lugar. Específicamente en la hembra del morfotipo 2 (C) se puede notar la falta melanóforos en su patrón. (D) Vista Lateral, dorsal y ventral del Morfotipo 3 . (E) Vista Lateral, dorsal y ventral del morfotipo 4.



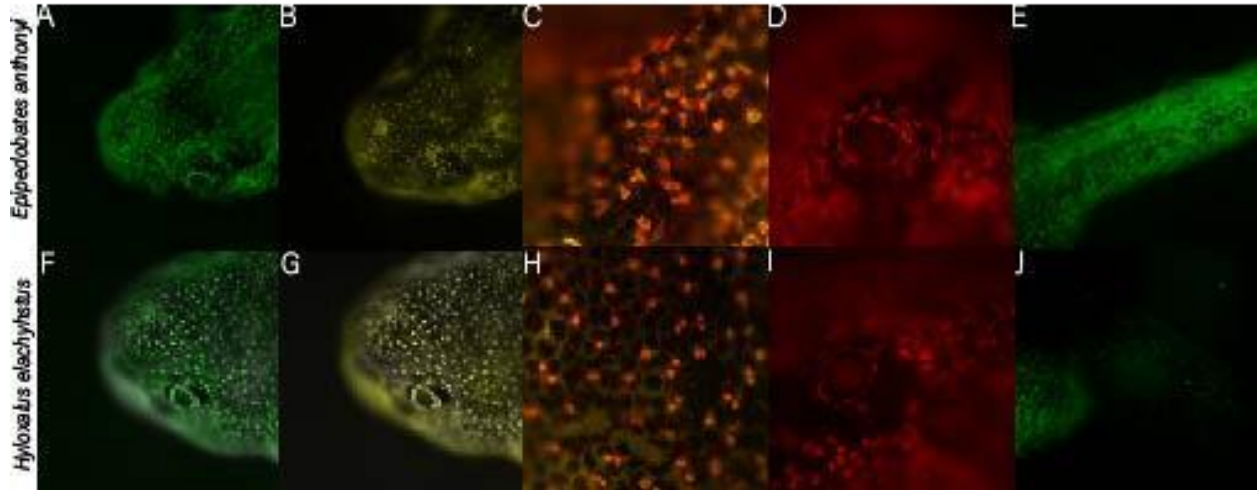
**Figura 2.** Desarrollo del desarrollo de patrones de pigmentación de morfotipos de *Epipedobates anthonyi* (A) Desarrollos de patrón de pigmentación de morfotipo 1. (B y C ) Desarrollo de patrón de pigmentación de cruce de morfotipo 2 con morfotipo 4. (B) Desarrollo morfotipo similar al dos. (C) Desarrollo de patrón de pigmentación similar al 4. (D) Desarrollo de patrón de pigmentación del morfotipo 3. (E) Desarrollo del patrón de pigmentación del morfotipo 4. Los números representan el tiempo post-metamorfosis. (1) Primer mes (2) Tercer mes, (3) Sexto mes (4) Octavo mes



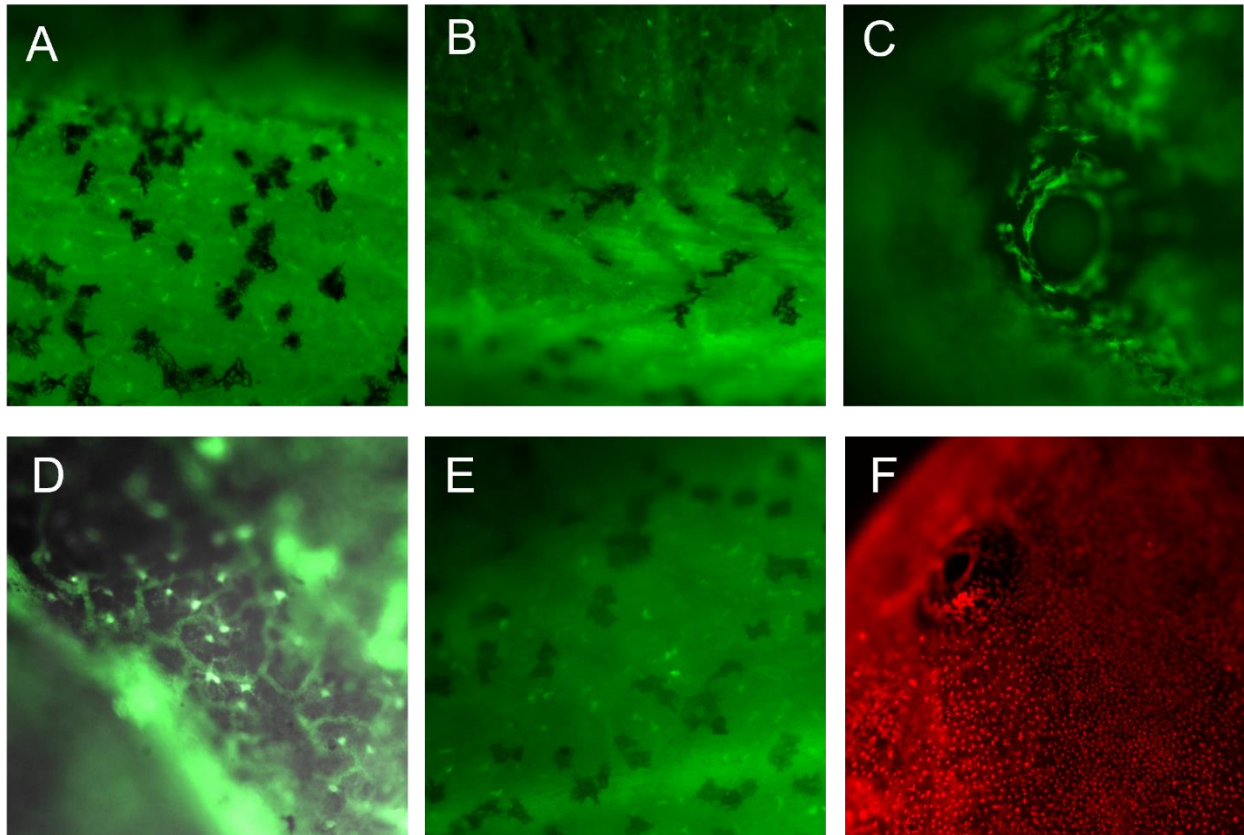
**Figura 4.** Desarrollo del patrón de pigmentación de *Hyloxalus elachyhistus*. A) Vista dorsal y lateral de aproximadamente un mes de desarrollo post-metamorfosis. (B) Vista dorsal y lateral de dos meses de desarrollo de patrón de pigmentación post-metamorfosis . (C) Vista dorsal y lateral de desarrollo de patrón de pigmentación 3 meses después de metamorfosis. (D) Vista lateral del patrón de pigmentación 6 meses post-metamorfosis



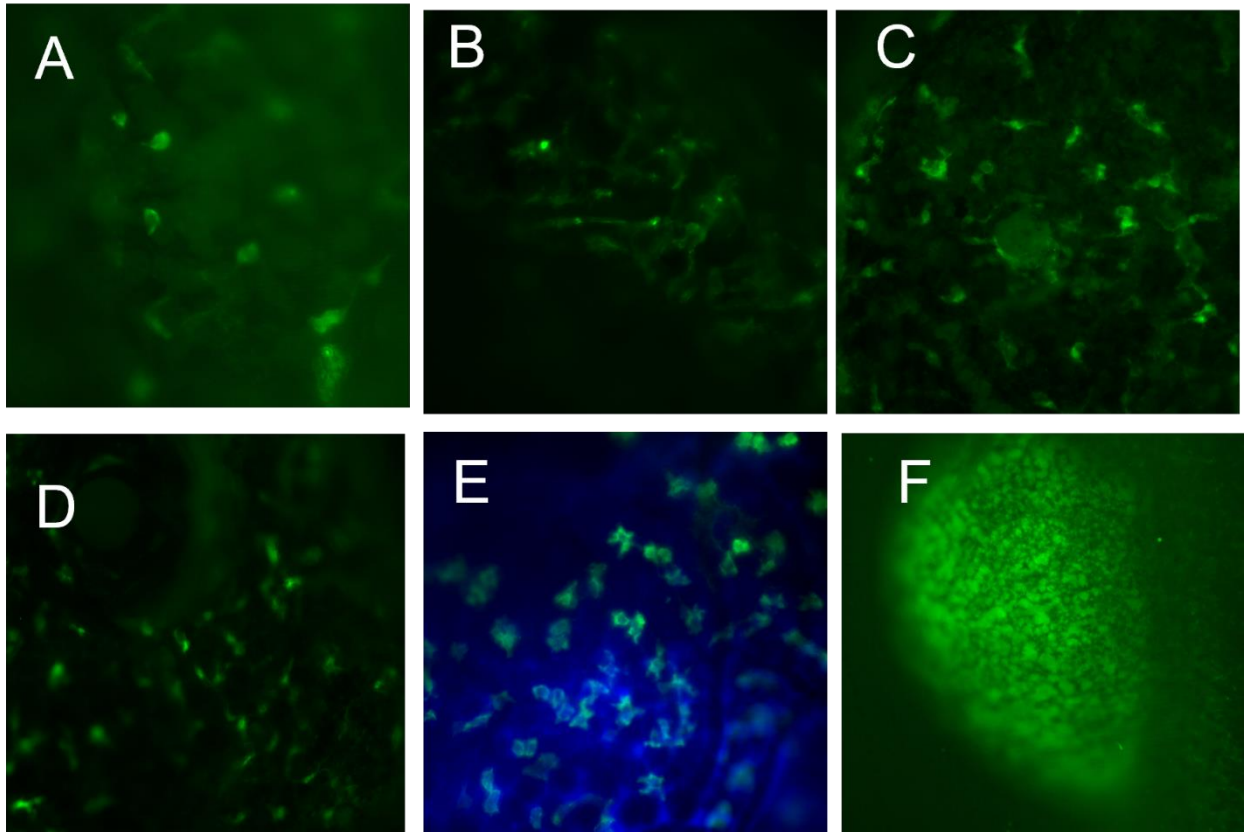
**Figura 5.** Comparación de desarrollo de patrón de pigmentación en metamorfos con cola de *E.anthoyi* y *H .elachyhistus*. . (A)Patrón de iridóforos de metamorfos con cola de *E. anthoyi*. (B) Patrón de iridóforos de metamorfos con cola de *H. elachyhistus*. (C) Distribución de iridóforos para la formación de franjas de la piel. (D) Distribución y agrupación de iridóforos en la piel de *H. elachyhistus*.



**Figura 6.** Comparación de células iridiscentes y auto fluorescentes de *E. anthonyi* y *H. elachyhistus* en estadio 25 (A) Vista dorsal de patrón de células fluorescentes (Xantóforos) de *E. anthonyi* en estado 25. (B) Vista dorsal de cabeza de un embrión de *E. Anthonyi* en st 25 con luz transmitida, aquí se logra ver la distribución de iridóforos. (C) superposición de iridóforos (amarillo ) y xantóforos (rojo) de la cabeza de un embrión de *E. anthonyi* en st 25. (D) Células fluorescentes en embrión. (E)Vista dorsal de la cola, acumulación de células fluorescentes en la cola (Fig. 6). (F) vista dorsal de la distribución de célula fluorescentes (xantóforos). (G)Vista dorsal de la distribución de células iridiscentes (iridóforos). (H) Superposición y acercamiento a células fluorescentes e iridiscentes de la cabeza. (I) Distribución de células fluorescentes alrededor del ojo y en el ojo. (J) Fluorescencia de la cola.



**Figura 7.** Estructuras auto fluorescentes en otros estadios de *E. anthonyi*. (A)Acercamiento de sección dorsal de la cola en estadio 23, se ven áreas oscuras que son los melanóforos y las células auto fluorescente.(B)Fluorescencia en la musculatura de la cola de embrión en estadio 23, melanóforos y xantóforos (C)Estructura ramificada de células auto fluorescente en el ojo de un embrión e estadio 24(D)Células de pigmento de la cabeza de un embrión en estadio 24.(E)Fluorescencia de la cola de embrión en estadio 24.(F) Distribución de Xantóforos en un embrión tras dos semanas de eclosión.



**Figura 8** Estructuras auto fluorescentes en otros estadíos de *H. elachyhistus*. (A)Células con estructura más redonda en parte dorsal de la cabeza de embrión en estadío 23.(B)Distribución de células fluorescentes en la cola de embrión en estadío 23(C y D)Perspectivas de xantóforos distribuidos en el ojo y alrededor del ojo st 24(E)Células fluorescentes en cabeza de embrión en estadío 24 (F) Yema fluorescente de embrión en estadío 23.