



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Mecanismo de eclosión de tres especies del orden Anura: *Hyloxalus awa*,  
*Epipedobates anthonyi* (Dendrobatidae) y *Espadarana prosoblepon*  
(Centrolenidae)**

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

**Daniela Isabel Flores Bolaños.**

Marco Andrés Romero- Carvajal, Ph.D.  
Director de la Disertación  
Quito, junio 2022

*A mi familia*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi madre por su constante apoyo, cariño, esfuerzo, sacrificio, paciencia y por ser un ejemplo para mí en todos los aspectos. También agradezco a mis abuelos y tíos por cuidarme siempre y brindarme su amor y apoyo incondicional.

A mis amigos, especialmente a Estíbaliz y Paúl por brindarme su amistad durante toda la carrera, por los buenos momentos y todas las anécdotas que hemos vivido juntos.

Agradezco al Doctor Marco Andrés Romero-Carvajal por permitirme formar parte del laboratorio de biología del desarrollo, por su motivación, enseñanzas, apoyo y por orientarme durante el desarrollo de mi trabajo de titulación. A Daniela Zurita, por compartir sus conocimientos, por guiarme y brindarme su apoyo y sugerencias. A los técnicos y a todos los que forman parte del laboratorio, por sus enseñanzas, las experiencias y los gratos momentos compartidos.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento que ha hecho posible realización de este proyecto. A la Iniciativa de Conservación Balsa de los sapos, por brindarme los especímenes necesarios para mi investigación. Al Laboratorio de Caracterización de Nanomateriales de la ESPE dirigido por el Doctor Debut, por su ayuda con las fotografías para Microscopia Electrónica de Barrido.

## **Tabla de contenido**

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. PALABRAS CLAVE.....</b>	<b>1</b>
<b>3. ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>4. KEYWORDS.....</b>	<b>2</b>
<b>5. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>6. OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
<b>6.1. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>7</b>
<b>6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>8</b>
<b>7. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>8</b>
<b>7.1 OBTENCIÓN DE EMBRIONES.....</b>	<b>8</b>
<b>7.2. FIJACIÓN DE EMBRIONES.....</b>	<b>8</b>
<b>7.3. INMUNODETECCIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>7.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (SEM).....</b>	<b>11</b>
<b>3.5. VIDEOS DE ECLOSIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>12</b>
<b>8.1. DISTRIBUCIÓN Y MORFOLOGÍA DE LAS GLÁNDULAS DE ECLOSIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>8.2. ECLOSIÓN POR ESTÍMULO.....</b>	<b>15</b>
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>22</b>
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>23</b>
<b>12. FIGURAS.....</b>	<b>26</b>

## 1. RESUMEN

El mecanismo de eclosión de anuros esta mediado por glándulas de eclosión (HGC), las cuales liberan una enzima proteolítica que digiere la membrana vitelina y capas de gelatinas. El patrón y morfología de las HGC varían entre especies y están relacionadas con el tiempo de eclosión. La plasticidad en la eclosión permite mejorar la supervivencia de las crías. Adelantar la eclosión frente a amenazas permite el escape de los embriones de depredadores y retrasar la eclosión permite un mejor desarrollo de los embriones en ambientes con pocas perturbaciones o cuidado parental.

En este estudio, mediante inmunohistoquímica y Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) se observó la presencia de glandulas de eclosión en la cabeza y dorso de los embriones, *Epipedobates anthonyi*, *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus awa* en los últimos estadios de desarrollo, antes de la eclosión. Los patrones de distribución fueron diferentes entre especies. Sin embargo, la morfología de *Epipedobates anthonyi* y *Hyloxalus awa* (Dendrobatidae) fue similar entre sí, pero diferente a la de *Espadarana prosoblepon* (Centrolenidae). La eclosión por estímulo ocurrió con mayor frecuencia en embriones en el último estadio previo a la eclosión. Se propone que esto puede deberse al cuidado parental y a la ventaja que tienen los embriones más desarrollados para escapar de depredadores.

## 2. PALABRAS CLAVE

Anfibios, anuros, glándulas de eclosión, enzima de eclosión, plasticidad de eclosión, cuidado parental, eclosión estimulada ambientalmente.

### 3. ABSTRACT

The hatching mechanism of anurans is mediated by hatching glands (HGCs) that release a proteolytic enzyme that digests the vitelline membrane and gelatin layers. The pattern and morphology in which HGCs are present vary among species and are associated to the time of hatching. Hatching plasticity improves hatchling survival. Early hatching in case of threats allows the escape of embryos from predators, and the delaying of hatching allows better development of embryos in environments with little disturbance or parental care.

In this study, we observed the presence of hatching glands on the head and dorsum of embryos of *Epipedobates anthonyi*, *Espadarana prosblepon*, and *Hyloxalus awa* at late developmental stages, before hatching, using immunohistochemistry and Scanning Electron Microscopy (SEM). The morphology of *Epipedobates anthonyi* and *Hyloxalus awa* (Dendrobatidae) was alike to each other but different from that of *Espadarana prosblepon* (Centrolenidae). Stimulus hatching occurred more frequently in embryos in the last stage prior to hatching. It is proposed that this may be due to parental care and the advantage of more developed embryos to escape predators.

### 4. KEYWORDS

Amphibians, anurans, hatching glands, hatching enzyme, hatching plasticity, parental care, environmentally cued hatching.

### 5. INTRODUCCIÓN

En anfibios, la eclosión es un proceso complejo y crítico del desarrollo que implica cambios en la fisiología y comportamiento de los embriones (Cohen et al., 2018; Warkentin, 1995). Este

cambio de fase embrionaria a fase larval también implica cambios en la dieta, hábitat, depredadores e incluso en las tasas de mortalidad y crecimiento (Martin, 1999).

En varios animales, desde equinodermos hasta mamíferos, se ha registrado un fenómeno durante la eclosión conocido como plasticidad en la eclosión (Armstrong et al., 2013; Martin, 1999; Warkentin, 2011a). En anfibios, la plasticidad durante la eclosión ocurre como respuesta a condiciones ambientales que llegan como señales externas que indican amenazas u oportunidades y permiten que los embriones programen su eclosión cuando las condiciones son favorables (Moran, 1992; Via & Lande, 1985; Warkentin, 1995; Warkentin et al., 2017). La eclosión puede requerir mucha demanda física por parte de los embriones debido a todas las capas y membranas de las que los embriones tienen que salir (Altig & McDiarmid, 2007; Dumont & Brummett, 1985).

Los embriones, poseen la capacidad de adelantar o retrasar su eclosión, en función de incrementar su supervivencia evitando ataques de depredadores (Warkentin 1995; Yamagami 1988). La eclosión temprana de los embriones puede implicar dificultades, debido a que no están totalmente desarrollados y además se pueden comprometer funciones de protección que proveen las capas de gelatina y membrana vitelina (Warkentin, 2011a; Warkentin et al., 2017). Por otra parte, cuando los embriones se encuentran relativamente a salvo pero la mortalidad de los renacuajos eclosionados es alta, se favorece el retraso de la eclosión. En resumen, los embriones eligen eclosionar antes cuando la mortalidad embrionaria es alta, pero la mortalidad de los renacuajos eclosionados es baja (Warkentin, 1995).

Un ejemplo de eclosión provocada por el ambiente, es *Dendropsophus ebraccatus*, si las crías, al eclosionar, están rodeadas de depredadores, permanecen más tiempo dentro de sus membranas protectoras y eclosionan antes si están expuestos a desecaciones (Cohen et al., 2018). Lo mismo sucede en *A. callidryas*, cuando los adultos depositan sus crías en lugares con pocas perturbaciones, las crías suelen ser más grandes y más desarrolladas, lo que mejora sus probabilidades de supervivencia post-eclosión (Cohen et al., 2019). De esta forma, los embriones reciben señales que les permiten regular su tiempo de eclosión de manera adaptativa. Estas señales pueden ser químicas, eléctricas, hidráulicas, acústicas o estímulos físicos, probablemente detectados por electrorreceptores presentes en el sistema de la línea lateral y mecanorreceptores de la línea lateral y del oído interno (Cohen et al., 2018; Hettyey et al., 2012; Warkentin et al., 2017).

El orden Anura presenta las estrategias reproductivas más variadas y diversas de entre todos los órdenes de vertebrados, esto basado en factores como el lugar de postura de sus crías, forma de desarrollo, tipo de cría y anidación, tamaño, estructura y cuidado parental (Altig & McDiarmid, 2007; Meegaskumbura et al., 2015; Salthe, 1963; Wells, 2007). No obstante, todos los embriones comienzan su desarrollo dentro de una membrana vitelina producida por el ovario. Además, existen capas gelatinosas conformadas por mucopolisacáridos y ácidos sulfatados que son secretadas por el oviducto, las cuales brindan protección, limitan y permiten interacción con el ambiente (Salthe, 1963; Seymour & Bradford, 2011; Warkentin, 2011b). Estas membranas protectoras también influyen en la plasticidad de eclosión, puesto que el suministro de oxígeno (que se difunde a través de la membrana vitelina hasta el embrión) es un factor importante para el desarrollo del embrión antes de la eclosión (Warkentin, 2007).

En Anuros, el mecanismo general de eclosión ocurre por la secreción de enzimas proteolíticas que provienen de las células de la glándula de eclosión (HGC) presentes en la cabeza y espalda del embrión (Altig y McDiarmid, 1999; Nokhbatolfoghahai & Downie, 2007). Para anuros que se reproducen en el agua, las HGC se presentan en forma de espesas microvellosidades en la superficie apical (Yoshizaki & Yamamoto, 1979; Fox, 1986; Yoshizaki, 1991). La enzima proteolítica de eclosión (HE) viaja hasta la membrana vitelina y a las capas de gelatina para digerirlas (Cohen et al., 2018).

En algunas especies de anuros, como en *D. ebraccatus*, la membrana vitelina se rompe o degrada de forma gradual antes de la eclosión; en *Dendropsophus microcephalus*, el pico de abundancia de glándulas de eclosión disminuye antes de la eclosión y en *Agalychnis callidryas*, el tamaño de la membrana vitelina es constante previo a la eclosión (Cohen et al., 2018; Nokhbatolfoghahai & Downie, 2007; Yoshizaki & Katagiri, 1975; Yoshizaki, 1978; Yamasaki et al., 1990).

La especie de rana arborícola *Agalychnis callidryas* digiere solamente una pequeña parte de la membrana vitelina momentos antes de salir, gracias a que tiene dos tipos de células de la glándula eclosión, HGC tempranas y HGC tardías, ambas distintas morfológicamente (Cohen et al., 2016, 2018). Las HGC tempranas están presentes desde el tercer hasta el quinto día, mientras el embrión aún se encuentra dentro de sus membranas protectoras. Por otro lado, las HGC tardías, intervienen en gran parte con el proceso de eclosión y su concentración aumenta al cuarto día y disminuye después de la eclosión (Cohen et al., 2018).

Sin embargo, en ambos tipos de células existe una liberación regulada de la enzima de eclosión. El gen de la enzima de eclosión se expresa en el hocico y la línea media dorsal y varía en su patrón y abundancia según el estadio del embrión. Su expresión comienza antes que las

HGC se presentan en la superficie y luego su patrón coincide y está limitado a las HGC tempranas (Cohen et al., 2018).

En el género *Xenopus*, el correcto funcionamiento de las glándulas de eclosión está mediado por canales de uniones GAP, los cuales se forman gracias a proteínas llamadas conexinas (Levin & Mercola, 2000). Además, los canales KATP también han sido reportados como factores reguladores necesarios para el proceso de eclosión para este género (Cheng et al., 2002).

En las ranas de la familia Dendrobatidae, sus estrategias reproductivas, desarrollo embrionario, patrones de gastrulación entre otros factores, han generado interés por su estudio (Hervas et al., 2015).

Las especies *Hyloxalus awa* y *Epipedobates anthonyi* pertenecen a esta familia, siendo *H. awa* una especie asociada a cuerpos de agua, presenta cuidado parental alternado entre la hembra y el macho (Coloma, et al., 2019). Mientras que *E. anthonyi* habita en hojarascas de bosques densos y el cuidado parental ocurre principalmente por el macho, el cual humedece las posturas de forma constante (Coloma, et al., 2019).

En ambas especies, los machos son los que transportan los renacuajos sobre su dorso. En *E. anthonyi*, se ha observado que machos transportan a los renacuajos dentro de una ampolla llena de fluido después de que ocurre la eclosión, aproximadamente 14 días (Coloma et al., 2018).

Por otro lado, en las especies pertenecientes a la familia Centrolenidae, conocidas como ranas de cristal, el desarrollo embrionario ocurre en la vegetación terrestre y su fase larval se da en los sedimentos de arroyos béticos hasta el momento de la metamorfosis (Delia et al., 2018). Según lo reportado por Delia y colaboradores (2018), cinco especies de ranas de cristal tienen plasticidad de eclosión, retrasándola a más del doble de su periodo embrionario mínimo

y también adelantando su eclosión en caso de peligro o abandono de los padres (Delia et al., 2018). *Espadarana prosoblepon*, especie que se distribuye por los Andes ecuatorianos, pertenece a esta familia. Los adultos suelen colocar a sus crías en hojarasca, rocas o ramas que están cercanas a los riachuelos y su cuidado parental no es muy prolongado (Guayasamin, 2022).

El mecanismo de eclosión mediado por las HGC está presente en varias especies del orden Anura (Cohen et al., 2019; Nokhbatolfoghahai & Downie, 2007). A pesar de ello en Ecuador ha sido descrito únicamente en dos especies *Hyloxalus nexipus* y *Epipedobates tricolor* (Zurita, 2020). En este estudio se buscó ampliar el conocimiento que se tiene sobre el mecanismo de eclosión, examinando a tres especies más de este orden, *Epipedobates Anthonyi*, *Hyloxalus awa* (Dendrobatidae) y *Espadarana prosoblepon* (Centrolenidae) con el fin de determinar la presencia distribución y morfología de las glándulas de eclosión (HGC) y enzima de eclosión (HE) por medio de inmunodetección y microscopía electrónica de barrido (SEM) y también determinar la respuesta de reacción los embriones por medio de estímulos grabados en video.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar el mecanismo de eclosión de tres especies del orden Anura: *Hyloxalus awa*, *Epipedobates anthonyi* (Dendrobatidae), *Espadarana prosoblepon* (Centrolenidae) mediante la presencia de las células de glándula de eclosión y enzima de eclosión y contrastar los resultados con los mecanismos de eclosión ya descritos de: *Hyloxalus nexipus* y *Epipedobates tricolor*.

## 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la morfología, distribución y función de las células de glándula de eclosión en embriones de *H. awa*, *E. anthonyi*, *E. prosoblepon*
- Identificar los estadios en los que se presentan las células de glándula de eclosión en *H. awa*, *E. anthonyi*, *E. prosoblepon*
- Realizar una comparación morfológica, de funcionamiento y distribución de las HGC entre las especies: *H. awa*, *E. anthonyi*, *H. nexipus* y *E. tricolor*.

## 7. MATERIALES Y METODOS

### 7.1 OBTENCIÓN DE EMBRIONES.

Los embriones de *H. awa*, *E. anthonyi* y *E. prosoblepon* fueron obtenidos del proyecto “Balsa de los sapos” de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, las puestas de embriones fueron mantenidas en cámaras húmedas, hechas en cajas Petri auto clavadas con pequeños cuadros de papel absorbente y plástico humedecidos con agua filtrada para mantener las condiciones de los embriones para evitar desecación o contaminación por hongos.

### 7.2. FIJACIÓN DE EMBRIONES

Los embriones de *H. awa*, *E. anthonyi* (Dendrobatidae) y *E. prosoblepon* (Centrolenidae) fueron fijados en los últimos estadios del desarrollo: 23, 24, 25 de acuerdo con las tablas de desarrollo de del Pino y colaboradores (2004); Hervas y colaboradores (2015); Salazar-Nicholls (2015). En el estadio 23, en dendrobátidos se distinguen branquias externas totalmente desarrolladas y extendidas, los ojos y resto del cuerpo están pigmentados, el pliegue opercular se está formando, en el primer par de branquias se observan 4 o 9 ramificaciones en las branquias dependiendo de la especie, mientras que en el segundo par de branquias no se observan ramificaciones. En centrolénidos, se observan en el primer par de branquias 5-4

ramificaciones, mientras que en el segundo 4-3, las branquias alcanzan su tamaño completo y el pliegue opercular está en formación. En estadio 24, las branquias son únicamente visibles en el lado izquierdo. En estadio 25, los embriones de dendrobátidos tienen apariencia de renacuajos, se puede observar las espirales del intestino y espiráculo y hay pigmentación de dientes en la boca, en centrolénidos, los embriones están cerca de la eclosión, es visible una pequeña parte de las branquias, se observan ojos pequeños (del Pino et al., 2004; del Pino & Sáenz-ponce, 2015).

Para evitar el movimiento, los embriones fueron colocados en una caja Petri que contenía Steinberg 1x sobre hielo, los embriones fueron agitados suavemente hasta que no hubo movimiento, se removió las capas de gelatina y membrana vitelina. Los embriones fueron colocados en tubos de microcentrífuga que contenían 1,5 ml de la solución del fijativo, Paraformaldehído al 4% en PBS 1X a una temperatura de 4°C, se los mantuvo durante a esa temperatura por 48 horas, luego se cambió el fijativo a metanol al 100% de forma gradual, 25%, 50%, 75% y 100%, se los almaceno a -20°C hasta el comienzo de la inmunodetección.

### **7.3. INMUNODETECCIÓN**

Las colas de los embriones fueron removidas al empezar la inmunodetección. Según la metodología de Brinvanlou y Harland (1989), el metanol fue remplazado gradualmente con lavados de PBS 1X para rehidratar los embriones en porcentajes de: 25%, 50%, 75%, 100%, durante 5 minutos cada uno. Posterior a esto se realizaron 4 lavados más de 5 minutos con la misma solución.

El proceso de permeabilización fue realizado con solución de PBS-Tr, durante este lavado el embrión estuvo en movimiento por 20 minutos, después se realizaron 6 lavados más con la misma solución: 4 lavados de 5 minutos y 2 de 10 minutos.

La solución de bloqueo previene uniones no específicas en los tejidos y fue colocada en los tubos de microcentrífuga que contenían los embriones durante una hora a temperatura ambiente en movimiento continuo y después dos horas más a 4°C.

El anticuerpo primario, Hatching Enzyme 347, donado por Karen Warkentin fue disuelto en la solución de bloqueo a una concentración de 1:500 y se lo colocó durante 48 horas a 4°C. Los tubos con embriones fueron agitados constantemente en este periodo.

Pasadas las 48 horas el anticuerpo fue removido y se realizaron 7 lavados en movimiento de PBS-Tr: 4 lavados de 5 minutos, 2 lavados de 10 minutos y un último lavado de 20 minutos.

Para colocar el anticuerpo secundario, los embriones fueron llevados a condiciones de oscuridad. El anticuerpo secundario empleado fue SIGMA anti-rabbit IgG (Lote:10C0128; Código: SAB 4600310) el cual fue diluido en solución de bloqueo, concentración de 1:750. Los tubos de microcentrífuga fueron cubiertos con papel aluminio para evitar su exposición a la luz, el anticuerpo fue colocado por 24 horas, agitando los tubos constantemente.

Como parte final del proceso de inmunodetección se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS 1x, luego 6 lavados en movimiento con la misma solución por 10 minutos cada uno. Los embriones fueron post-fijados con Formaldehído al 4% en PBS 1x.

En las inmunodetecciones se revisó principalmente la parte dorsal y frontal de los embriones, los cuales fueron colocados en cajas de vidrio con solución de Formaldehído al 4% en PBS 1X. El microscopio empleado fue Nikon Eclipse Ni, las fotografías fueron tomadas con la cámara MshotMs60 usando el programa Mshot Image Analysis System (Guangzhou Microshot Technology, 2014).

#### **7.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (SEM)**

Para la microscopia electrónica, los embriones fueron fijados con el mismo método de la inmunodetección, empleando el fijativo Glutaraldehído 5% + Paraformaldehído al 2% en PBS 1X (Cohen et al., 2018).

Los embriones fueron deshidratados 72 horas antes de iniciar con la microscopia electrónica, se realizaron lavados graduales con Etanol: 25%, 50%, 75%, 100%, 100% y 100%, cada lavado duró 20 minutos. Después de la deshidratación se almacenó los embriones a una temperatura de 4°C.

La liofilización, cobertura de oro y observación de muestras fue llevada a cabo en el laboratorio de Caracterización de Nanomateriales, a cargo de Alexis Debut Ph.D. En la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE). Las muestras fueron liofilizadas por 48 horas a 62°C y A 1.2 Pa, después de esto los embriones fueron diseccionados a la mitad, se los colocó sobre cinta en un porta-muestras, de forma ventral para que la cabeza quede orientada hacia arriba.

En el Evaporizador de oro Sputter Coating Quorum Q105R, las muestras fueron cubiertas por una capa de oro de 20 nm, en las siguientes condiciones: 15 mA y 80 m Torr por 90

segundos. El Microscopio Electrónico de Barrido en el que las muestras fueron observadas fue marca TESCAN modelo MIRA 3.

### 3.5. VIDEOS DE ECLOSIÓN

Estos experimentos fueron realizados en el estereomicroscopio Olympus SZX1. Los embriones fueron colocados sobre una caja Petri que contenía unas gotas de agua filtrada a temperatura ambiente. Mediante una cánula se agitó a cada embrión aproximadamente por 10 segundos. Entre cada estímulo se esperó alrededor de 25 segundos y se repitió el proceso por 60 minutos o hasta observar la eclosión del embrión según el protocolo de Cohen y colaboradores (2016). Se realizaron 10 videos por estadio en cada especie, los cuales fueron grabados con el programa a Cell Sense Estandar (Olympus Corporation, 2020).

## 8. RESULTADOS

### 8.1. DISTRIBUCIÓN Y MORFOLOGÍA DE LAS GLÁNDULAS DE ECLOSIÓN

Se identificaron glándulas de eclosión en los embriones de las tres especies de anuros: *Epipedobates anthonyi*, *Hyloxalus awa* y *Espadarana prosoblepon* en los estadios cercanos a la eclosión 23, 24 y 25 (Fig. 1, Fig. 2 y Fig 3).

Para *Epipedobates anthonyi*, la presencia de HGC, observadas mediante inmunohistoquímica y microscopía electrónica de barrido (SEM) desde el estadio 23 hasta el 25 (Fig.1) las glándulas de eclosión están distribuidas en la cabeza y dorso. En estadio 23 (Fig. 1A-B) la acumulación de glándulas de eclosión es más notoria en la zona de los ojos y narinas, mientras que en el dorso se marcan varias células sin un patrón definido (Fig. 1C). En el estadio 24 (Fig.1H-J), se observaron células marcadas entre los ojos y unos pocos parches alrededor. En la zona de las narinas hubo acumulación de células marcadas. En el dorso, hay varias células marcadas y se logra distinguir una acumulación de células que va desde la altura del ojo hacia

posterior alrededor de la línea media dorsal.. En el estadio 25 (Fig.1O-Q) hay menos células marcadas en la zona frontal, sin embargo, en el dorso hay un patrón más definido de las células marcadas para HE, se observaron dos líneas a la altura de la mitad de los ojos que van hacia el dorso, a los lados de la línea media dorsal y en el medio de las dos líneas hay un parche de células. A medida que los embriones están en estadios más avanzados del desarrollo fue observado un patrón más definido de células marcadas para HE. En cuanto a su morfología, se observaron glándulas triangulares, poligonales y elipsoides (Fig.1 D-U). En el estadio 23 las glándulas tienen microvellosidades o microvilli cortos, siendo las glándulas con forma elipsoide en las fueron observadas microvellosidades más cortas (Fig.1E-G) en el estadio 24 fueron observadas glándulas de la misma forma, pero con microvellosidades un poco más largas (Fig. 1K-L, 1N) En el estadio 25 la forma de las glándulas es igual a los estadio 23 y 24 , sin embargo, no fueron observadas microvellosidades (Fig. 1R-S) y la presencia de las glándulas fue menor en la parte dorso-lateral (Fig 1. T-U).

En *Hyloxalus awa*, las glándulas de eclosión están distribuidas en la zona frontal y dorsal de la cabeza, también hay unas pocas células marcadas a los laterales del embrión (Fig. 2A-M) las glándulas están distribuidas en la parte posterior de la cabeza, en y alrededor de los ojos y en medio de las narinas (Fig. 2B y 2K). En el estadio 23 se pudo observar una mayor cantidad de células marcadas tanto en el dorso como en la parte frontal de los embriones (Fig. 2 A-B). En el estadio 24 y 25 se pudo observar menor cantidad de células marcadas (Fig. 2 F-G). Mediante SEM, la morfología de las glándulas pudo ser observada, hubo presencia de glándulas poligonales, triangulares y elipsoides en todos los estadios. En estadio 23 se observaron microvellosidades cortas en las glándulas, siendo algunas de las glándulas con forma elipsoide en las que las microvellosidades eran más cortas a comparación con las glándulas triangulares

o poligonales (Fig. 2 D-E). En estadio 24 (Fig. 2I-J) las glándulas tienen microvellosidades más largas con respecto al estadio 23. En el estadio 25 (Fig. 2N-O) no se pudo observar microvellosidades y las glándulas parecen ser de mayor tamaño con respecto al estadio 23 y 24.

En *Espadarna prosoblepon* las glándulas de eclosión HGC se marcaron por inmunohistoquímica (Fig. 3 A-S) en la parte dorsal y frontal de la cabeza, se identificaron mayor presencia de las glándulas alrededor de los ojos, a los costados de las narinas y en la zona en medio de la boca y narinas, en el medio de los ojos la concentración de glándulas de eclosión disminuye. En la línea dorsal media y laterales también se pudo observar la presencia de glándulas de eclosión. En el estadio 23 se pudo observar cómo hay mayor concentración de glándulas de eclosión HGC en la parte posterior de la cabeza y el tronco del embrión desde una vista dorsal (Fig. 3B) en el estadio 24 y 25 (Fig. 3J y 3R) es menor la concentración de células marcadas, siendo unos pocos parches o pocas células marcadas observadas. En el estadio 25 (Fig. 3 Q-S) hay mayor concentración de células marcadas en la parte frontal. Por medio de SEM en el estadio 23 se identificaron glándulas de enzima de eclosión en la parte dorsal, las glándulas de estas zonas tienen formas rectangulares, cuadradas y triangulares (Fig. 3D-E) mientras que en la parte anterior y frontal de la cabeza se observa glándulas únicamente redondas, en ambas morfologías se observa la presencia de microvellosidades. En el estadio 24 y 25 (Fig. 3L-M y 3T-U) se observa el mismo tipo de glándulas con formas triangulares, cuadradas y rectangulares en la parte dorsal, se puede observar las microvellosidades de estas glándulas más cortas con respecto a las glándulas del estadio 23, mientras que en la parte frontal del estadio 24 y 25 (Fig. 3N-P y 3V-X) se aprecian las mismas glándulas redondas con microvellosidades más largas que en el estadio 23. En zonas como la parte posterior de la cabeza cerca al ojo (Fig. 3 T) se observan glándulas rectangulares, cuadradas y redondas.

La diferencia más notoria que se pudo observar entre Centrolenidae (*Espadarana prosoblepon*) es la presencia de glándulas de eclosión en el dorso con morfología cuadrada o rectangular y en la parte frontal únicamente glándulas redondas, mientras que en las dos especies pertenecientes a la familia Dendrobatidae (*Hyloxalus awa* y *Epipedobates anthonyi*) las glándulas tenían mayor concentración en la zonas frontal- dorsal de la cabeza y la morfología de las glándulas variaba entre triangulares, cuadradas, poligonales y elipsoides indefinidamente en toda esa área.

## 8.2. ECLOSIÓN POR ESTÍMULO MECÁNICO

En la familia Dendrobatidae, se observó que la eclosión por estímulo ocurrió con mayor frecuencia en embriones en el estadio 25 (Fig. 4C, 5C). En *E. anthonyi*, se observó la presencia de la burbuja de eclosión antes de que los embriones salieran de la membrana vitelina. Durante el estadio 24, se observó la eclosión por estímulo de un individuo (Fig. 7), lo que podría considerarse como un valor atípico para esta especie en ese estadio. En el estadio 23, no se observó eclosión por estímulo hasta los 60 minutos (Fig. 4A). En los estadios 23 y 24, se observaron movimientos leves cuando fueron agitados con la cánula, mientras que en el estadio 25 hubo una reacción más fuerte: los embriones se movieron rápidamente dentro de la membrana vitelina y se acercaron a varios puntos de la misma, lo que probablemente causó la formación de la burbuja de eclosión. La mediana de eclosión fue de 10,5 minutos (Fig. 7).

En *H. awa*, la eclosión por estímulo ocurrió únicamente en embriones en el estadio 25 (Fig. 5C). En los estadios 23 y 24 (Fig. 5A-5B), no hubo eclosión por estímulo mecánico hasta los 60 minutos, aunque hubo una reacción frente al estímulo y se observaron movimientos leves. En el estadio 25, se observó la formación de la burbuja de eclosión, al igual que en *E. anthonyi*. La mediana de eclosión para *H. awa* fue de 10,5 minutos (Fig. 7).

En *E. prosoblepon* (Centrolenidae), se observó la eclosión por estímulo en algunos embriones del estadio 25, aunque no se observó la burbuja de eclosión (Fig. 6C). En los estadios 23 y 24, no se observó eclosión por estímulo hasta los 60 minutos (Fig. 6A-6B). En el estadio 23, se esperó hasta los 82 minutos para observar si ocurría la eclosión al aplicar más tiempo el estímulo, lo que se considera un valor atípico (Fig. 7). La mediana de eclosión en *E. prosoblepon* en el estadio 25 fue de 35 minutos (Fig. 7).

## 9. DISCUSIÓN

Las glándulas de eclosión pueden ser encontradas en la mayoría de los embriones de anuros, se sabe que la morfología de las glándulas de eclosión puede variar entre especies, algunas de estas diferencias radican en forma, patrón, longitud y anchura (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2007). En *Xenopus laevis* se sabe que estas diferencias morfológicas tienen cierta relevancia durante el momento de eclosión (Bles, 1905). En varias especies se ha descrito la presencia de las glándulas de eclosión con mayor densidad en la parte anterior dorsal de la cabeza, también la presencia de células a lo largo de la línea media dorsal (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2007). En *Hyoxalus awa*, *Epipedobates anthonyi* y *Espadarana prosoblepon*, existe similitud en la distribución de glándulas de eclosión en las mismas zonas de la cabeza, sin embargo, no existe tanta concentración o un patrón definido de células en la línea dorsal media en *H. awa*; en *E. prosoblepon* se observan más células marcadas en esta zona en comparación *H. awa* y un patrón más definido de células llega a ser más evidente en *E. anthonyi*, con dos líneas a los lados de la línea media dorsal, además en la zona frontal de las tres especies existe una acumulación notable de glándulas de eclosión como en *A. callidryas* (Cohen et al., 2019). Existen pocos estudios sobre las glándulas de eclosión, sobre todo su morfología y distribución, para las familias de este estudio esta es la primera vez que se describe

la presencia, patrón y morfofología en las especies *Epipedobates anthonyi*, *Hyloxalus awa* y *Espadarana prosoblepon*, por lo cual no se puede generalizar sobre los patrones de distribución y abundancia en las que se encuentran las HGC durante el desarrollo embrionario (Cohen et al., 2018). Sin embargo, Altig y colaboradores (1999) y Nokhbatolfoghahai y colaboradores (2007) han descrito la presencia de las glándulas de eclosión agrupadas en la parte anterior de la cabeza con forma de Y o T en varias familias de anuros, en las tres especies de este estudio no se observa un patrón que coincida totalmente con los ya descritos.

En *E. anthonyi* y *H. awa* en estadio 23 la distribución de células marcadas, en la zona dorsal y frontal coincide con las especies de dendrobátidos previamente descritas, *Epipedobates tricolor* e *Hyloxalus nexipus* (Zurita, 2020). En *E. anthonyi* la concentración de células marcadas para enzima de eclosión es mayor en comparación al resto de especies en estadio 23.

En estadio 24 y 25 *E. anthonyi* y *H. awa* se observa acumulación de glándulas de eclosión en el hocico, lo que coincide con la distribución descrita para *E. tricolor* y *H. nexipus* (Zurita, 2020). Sin embargo, en *E. anthonyi* están presentes parches y líneas de células marcadas en la zona entre los ojos y en *H. awa* la concentración de células marcadas es menor que en el resto de las especies.

*E. anthonyi* en estadio 24 y 25 también mostró un patrón similar a *Leptodactylus bolivianus*, estadio 21 en el que se forman órganos adhesivos, diferenciación de los ojos y sin circulación en la aleta caudal según el sistema de clasificación de estadios de (Gosner, 1960) se observa un patrón de distribución de células en forma de T, con una mancha amplia conectada a la superficie dorsal de la cabeza, no existe extensión de células marcadas en la línea dorsal posterior, aunque en *E. anthonyi* la extensión de las células marcadas en la parte dorsal si llegan a la parte posterior de la cabeza. Mostrando similitud con la familia Bufonidae, no obstante en

el estadio 23 el patrón llegó a tener más similitud con *L. validus* en estadio 20, ya que son observadas células marcadas ampliamente en la zona dorsal del tronco (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2007).

*H. awa* en el estadio 23 presenta similitud con *P. pustulosus* únicamente en la parte anterior de la cabeza del embrión, en la parte del tronco no se observa ninguna similitud, puesto que, en *H. awa* son visibles varias células marcadas en el dorso, los embriones *A. callidryas* en sus diferentes etapas de desarrollo presentan más similitud con *H. awa*; a los 2,7 días *A. callidryas* expresa el gen de enzima de eclosión en zonas similares a la inmunohistoquímica de *H. awa* estadio 23; en el estadio 24 y 25 se marcan células por inmunohistoquímica en partes similares (hocico, pocas células en el dorso y en la línea dorsal media) en las que se expresa el gen para enzima de eclosión a los 5.6 días en *A. callidryas* (Cohen et al., 2019; Nokhbatolfoghahai & Downie, 2007). En cuanto a morfología de las HGC, *E. anthonyi* e *H. awa* tienen similitud entre sí, con glándulas de forma poligonal, triangular o rectangular que coincide con la morfología descrita de *E. tricolor*, pero difiere de *H. nexipus* que presenta glándulas redondeadas y con microvilli corto (Zurita, 2020).

Al comparar la morfología de *E. anthonyi* e *H. awa* con especies como, *A. callidryas*, *Boana crepitans*, *Boana geographica* o *Phyllomedusa trinitatis* se pueden observar distintas morfologías en diferentes estadios del desarrollo, en estadio 23, se observan HGC pequeñas presentes en las uniones de células epiteliales con distintas formas (Downie et al., 2013; Nokhbatolfoghahai & Downie, 2007). No obstante, en estas pequeñas HGC son evidentes microvilli cortos y aglomerados, sobre todo en las glándulas con forma elipsoide, en estadio 24 el microvilli que se proyecta de las glándulas es más largo y menos aglomerado. Las HGC presentes en estadio 23 y 24 de estas dos especies, tiene similitud con las glándulas de eclosión

tempranas previamente descritas, de igual forma, las HGC observadas en estadio 25, glándulas más grandes y con microvilli muy corto, son similares a las HGC tardías, descritas por Cohen y colaboradores (2019). Sin embargo, en ambas especies, no hubo solapamiento de las HGC que tienen similitud a las glándulas de eclosión tempranas, presentes en estadio 23 y 24, con las observadas en estadio 25, similares a las HGC tardías de previos estudios. Lo que puede sugerir que las glándulas de eclosión cambian su morfología mientras avanzan en su desarrollo como en *D. ebraccatus* y *Dendropsophus microcephalus*, en los que las HGC, son grandes con microvilli corto, pero después disminuyen en tamaño y el microvilli es más largo. Esto no ocurre en *A. callidryas* (Cohen et al., 2018; Nokhbatolfoghahai & Downie, 2007).

Como *E. anthonyi* y *H. awa* son especies que pertenecen a la misma familia, se esperaría más similitud en los patrones de distribución de las HGC por medio de inmunohistoquímica, no obstante, la morfología de las HGC es muy similar, aunque faltarían más repeticiones para determinar con más precisión las diferencias en morfología y distribución, en estos casos se sabe que especies pertenecientes al mismo género o familia tienen patrones similares pero no siempre son los mismos (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2007).

*Espadarana prosoblepon*, presenta células marcadas en la parte frontal, dorsal y línea media dorsal, están presentes células marcadas en la parte dorsal del saco de yema, (Delia et al., 2018). El patrón de células marcadas en estadio 23 puede ser comparado con el patrón que presenta *Bufo bufo*, familia Bufonidae, estadio 18/19 (Gosner, 1960), las HGC se distribuyen en la parte frontal de la cabeza y forman una línea que se extiende desde la punta de la cabeza hasta la parte posterior de la cabeza y a lo largo de la línea media dorsal (Cohen et al., 2019; Nokhbatolfoghahai & Downie, 2007). En centrolénidos, las HGC, han sido reportadas para la especie *Hyalinobatrachium orientale*, su distribución ha sido descrita en la parte antero-dorsal

de los embriones por medio de SEM, la distribución y morfología coincide con *E. prosoblepon*. En ambas especies las HGC de esta zona anterodorsal o dorsofrontal son redondas, con microvilli que se proyecta de ellas y estas interpoladas entre células epiteliales (Nokhbatolfoghahai et al., 2015). Sin embargo, no se describe el otro tipo de morfología presente en el dorso, línea dorsal media y la parte dorsal del saco de yema. Las HGC presentes en *E. prosoblepon* son claramente de dos tipos, las presentes en el tronco y las de la región anterodorsal. En las HGC anterodorsales, el microvilli pasa a ser de muy corto a más largo según los embriones avanzan en su desarrollo al igual que en *D. ebraccatus* y *D. microcephalus*, en cambio, las HGC del dorso se asemejan a las HGC tardías de *A. callidryas*, con microvellosidades cortas que no cambian a medida que el embrión se desarrolla (Cohen et al., 2019; Nokhbatolfoghahai et al., 2015). Las HGC presentes en *X. laevis* 17/18 y *Hyla microcephala* estadio 18/20 también son similares en forma a las de *E. prosoblepon* (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2007).

La eclosión inducida por el medio ambiente (ECH) es conocida al menos en 10 familias de anuros y se sabe que la aceleración de la eclosión puede ser hasta del 67% mientras que su retraso es de hasta el 600% (Cohen et al., 2018), por ejemplo, embriones de *A. callidryas* eclosionan 30% antes cuando percibe amenazas (Warkentin et al., 2001), en el caso de ataques de serpientes el promedio en el que eclosionan los embriones es de 16 segundos (Warkentin et al., 2007). En las tres especies de este estudio, no hubo un mecanismo de escape tan rápido frente a un estímulo externo. Los embriones de dendrobátidos, *H. awa* y *E. anthonyi*, incluso en estadio 25 frente al estímulo mecánico, eclosionaron a partir del minuto y otros no eclosionaron hasta los 40 o pasado los 40 minutos. El cuidado parental, que se da en la familia de las ranas venenosas puede ser un factor a considerar, los padres eligen cuidadosamente el lugar de

anidación, guiándose por señales que puedan indicar amenazas, además vigilan y humedecen las puestas de embriones constantemente y una vez que ocurre la eclosión suelen transportar a los renacuajos en su espalda (Roithmair 1994; Caldwell & de Oliveira 1999a; Summers & McKeon 2004; Lotters et al., 2007; von May et al., 2009; Brust 1993; Pramuk & Hiler, 1999; Summers, 1999; Poelman & Dicke, 2007). Esto podría influir en que los embriones no perciban los estímulos mecánicos como amenaza y se guíen por otra señales, ya sean químicas, auditivas o visuales (Hettyey et al., 2012).

*Espadarana prosoblepon*, fue la especie que mostró más variación en los experimentos de eclosión por estímulo mecánico. En las especies de centrolénidos que han sido estudiadas, se ha observado que los embriones pueden retardar su eclosión hasta los 19-21, extendiendo así, su tiempo de eclosión en promedio de 75-112,7% y con un máximo de retraso de 171-200% (Delia et al., 2018). Lo que difiere de especies como *A. callidryas* o *D. ebraccatus*, que evitan pasar tanto tiempo dentro de sus capas y membranas protectoras, desde que tienen la capacidad de eclosionar (Touchon & Warkentin 2010; Touchon et al., 2011; Warkentin et al., 2017). El desarrollo de las ranas de cristal es lento y de la misma manera su periodo embrionario es prolongado (Delia et al., 2018). En la especie *Hyalinobatrachium fleischmanni*, se sabe que los embriones pueden eclosionar en una fase temprana frente al abandono de sus padres, para enfrentar condiciones adversas. Se sabe que especies de centrolénidos como, *C. granulosa*, *H. colymbiphyllum*, *H. fleischmanni*, *T. spinosa*, eclosionan rápidamente frente a amenazas por depredadores, algo que no ocurre en *T. pulverata* (Delia et al., 2014, 2018). Sin embargo, se sabe que existe una ventaja para escapar de depredadores cuando los embriones están más desarrollados (Delia et al., 2018).

El mecanismo de eclosión de los centrolénidos de previos estudios es consistente con el observado en *E. prosoblepon*, sin embargo, se requiere de más repeticiones en los experimentos en los que se induce la eclosión por estímulo, para determinar con precisión si esta especie tiene la capacidad de eclosionar rápidamente frente a amenazas o no, ya que hubo individuos que eclosionaron a los 2 minutos y otros en los que no hubo eclosión hasta los 60 minutos.

## 10. CONCLUSIONES

Pese a que se ha estudiado el mecanismo de eclosión en varias especies de anuros, aún se conoce muy poco, sobre todo en las familias de este estudio. Se puede concluir que, en cuanto a morfología, las tres especies de este estudio presentan similitudes con otras especies previamente descritas, como *A. callidryas*, *Boana crepitans*, *Boana geographica*, *Phyllomedusa trinitatis* y *Hyla microcephala*. Sin embargo, el patrón observado mediante inmunohistoquímica no fue muy consistente y se deberían realizar más repeticiones para que un patrón claro pueda ser definido. Al igual que en las especies de dendrobátidos descritas por Zurita (2020), la eclosión por estímulo ocurre sobre todo en el estadio 25 y se observa la formación de burbuja de eclosión. Aunque el tiempo de eclosión es más prolongado en comparación con otras especies, como *A. callidryas*, aquí el cuidado parental podría tener influencia. *Espadarana prosoblepon* mostró concordancia en cuanto al tiempo de eclosión en otras especies de centrolénidos. Realizar más experimentos de eclosión por estímulo mecánico y probar la reacción de los embriones frente a otros estímulos podría ayudar a definir el mecanismo de eclosión en estas especies.

## 11.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Altig, R., & McDiarmid, R. W. (2007). Morphological diversity and evolution of egg and clutch structure in amphibians. *Herpetological Monographs*, 21(21), 1–32.  
<https://doi.org/10.1655/06-005.1>
- Armstrong, A. F., Blackburn, H. N., & Allen, J. D. (2013). A novel report of hatching plasticity in the phylum echinodermata. *American Naturalist*, 181(2), 264–272.  
<https://doi.org/10.1086/668829>
- Bles, E. J. (1905). XXXI.—The Life-History of *Xenopus laevis*, Daud. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 41(3), 789–821. <https://doi.org/10.1017/S0080456800035584>
- Briuanlou, A. H., & Harland, R. M. (1989). Expression of an engrailed-related protein is induced in the anterior neural ectoderm of early *Xenopus* embryos. *Development*, 106(3), 611–617.  
<https://doi.org/10.1242/dev.106.3.611>
- Cheng, S. M., Chen, I., & Levin, M. (2002). KATP channel activity is required for hatching in *Xenopus* embryos. *Developmental Dynamics*, 225(4), 588–591.  
<https://doi.org/10.1002/dvdy.10183>
- Cohen, K. L., Seid, M. A., y Warkentin, K. M. (2016). How embryos escape from danger: the mechanism of rapid, plastic hatching in red-eyed treefrogs. *The Journal of Experimental Biology*, 219(12), 1875–1883. <https://doi.org/10.1242/jeb.139519>
- Cohen, K. L., Piacentino, M. L., & Warkentin, K. M. (2018). The hatching process and mechanisms of adaptive hatching acceleration in hourglass treefrogs, *Dendropsophus ebraccatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 217, 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.020>
- Cohen, K. L., Piacentino, M. L., & Warkentin, K. M. (2019). Two types of hatching gland cells facilitate escape-hatching at different developmental stages in red-eyed treefrogs, *Agalychnis callidryas* (Anura: Phyllomedusidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 126(4), 751–767. <https://doi.org/10.1093/biolinlean/bly214>
- Del Pino, E. M., Ávila, M. E., Pérez, O. D., Benítez, M. S., Alarcón, I., Noboa, V., & Moya, I. M. (2004). Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *International Journal of Developmental Biology*, 48(7), 663–670. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041861ed>
- Delia, J., Rivera-Ordóñez, J. M., Salazar-Nicholls, M. J., & Warkentin, K. M. (2018). Hatching plasticity and the adaptive benefits of extended embryonic development in glassfrogs. *Evolutionary Ecology*, 33(1), 37–53. <https://doi.org/10.1007/s10682-018-9963-2>
- Delia, J. R. J., Ramírez-Bautista, A., & Summers, K. (2014). Glassfrog embryos hatch early after parental desertion. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1783), 20133237. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.3237>
- Downie, J. R., Nokhbatolfigohai, M., Bruce, D., Smith, J. M., Orthmann-Brask, N., & MacDonald-Allan, I. (2013). Nest structure, incubation and hatching in the Trinidadian leaf-frog *Phyllomedusa trinitatis* (Anura: Hylidae). *Phyllomedusa*, 12(1), 13–32.  
<https://doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v12i1p13-32>

- Dumont, J. N., & Brummett, A. R. (1985). Egg envelopes in vertebrates. *Developmental Biology* (New York, N.Y. : 1985), 1, 235–288. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6814-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6814-8_5)
- Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183–190. Retrieved from JSTOR. (3890061)
- Hervas, F., Torres, K. P., Montenegro-Larrea, P., & Del Pino, E. M. (2015). Development and gastrulation in *Hyloxalus vertebralis* and *Dendrobates auratus* (Anura: Dendrobatidae). *Amphibian and Reptile Conservation*, 8(1), 172–181. Retrieved from [https://amphibian-reptile-conservation.org/ARC\\_8\\_1\\_2015/ARC\\_8\\_1\\_172-181\\_Hervas\\_et\\_al\\_2015.pdf](https://amphibian-reptile-conservation.org/ARC_8_1_2015/ARC_8_1_172-181_Hervas_et_al_2015.pdf)
- Hettyey, A., Rölli, F., Thürlimann, N., Zürcher, A. C., & Van Buskirk, J. (2012). Visual cues contribute to predator detection in anuran larvae. *Biological Journal of the Linnean Society*, 106(4), 820–827. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.01923.x>
- Levin, M., & Mercola, M. (2000). Expression of connexin 30 in *Xenopus* embryos and its involvement in hatching gland function. *Developmental Dynamics*, 219(1), 96–101. <https://doi.org/10.1002/1097-0177.219.1.96>
- Martin, K. L. M. (1999). Ready and waiting: Delayed hatching and extended incubation of anamniotic vertebrate terrestrial eggs. *American Zoologist*, 39(2), 279–288. <https://doi.org/10.1093/icb/39.2.279>
- Meegaskumbura, M., Senevirathne, G., Biju, S. D., Garg, S., Meegaskumbura, S., Pethiyagoda, R., Hanken, J., & Schneider, C. J. (2015). Patterns of reproductive-mode evolution in Old World tree frogs (Anura, Rhacophoridae). *Zoologica Scripta*, 44(5), 509–522. <https://doi.org/10.1111/zsc.12121>
- Moran, N. A. (1992). The evolutionary maintenance of alternative phenotypes. *American Naturalist*, 139(5), 971–989. <https://doi.org/10.1086/285369>
- Nokhbatolfighahai, M., & Downie, J. R. (2007). Amphibian hatching gland cells: Pattern and distribution in anurans. *Tissue and Cell*, 39(4), 225–240. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2007.04.003>
- Nokhbatolfighahai, M., Pollock, C. J., & Downie, J. R. (2015). Oviposition and development in the glass frog *Hyalinobatrachium orientale* (Anura: Centrolenidae). *Phyllomedusa*, 14(1), 3–17. <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v14i1p3-17>
- Pino, E., & Sáenz-Ponce, N. (2015). Early Development of The Glass Frogs *Hyalinobatrachium leischmanni* and *Espadarana callistomma* (Anura: Centrolenidae) from Cleavage to Tadpole Hatching. *Amphibian & Reptile Conservation*, 8(1), 89–106.
- Salthe, S. N. (1963). The egg capsules in the amphibia. *Journal of Morphology*, 113(2), 161–171. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051130204>
- Seymour, R. S., & Bradford, D. F. (2011). Zoology of amphibian egg respiration. *Physiological and Biochemical Zoology*, 84(1), 1–25. <https://doi.org/10.1086/657368>
- Touchon, J. C., & Warkentin, K. M. (2010). Short- and long-term effects of the abiotic egg environment on viability, development and vulnerability to predators of a neotropical anuran. *Functional Ecology*, 24(3), 566–575. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

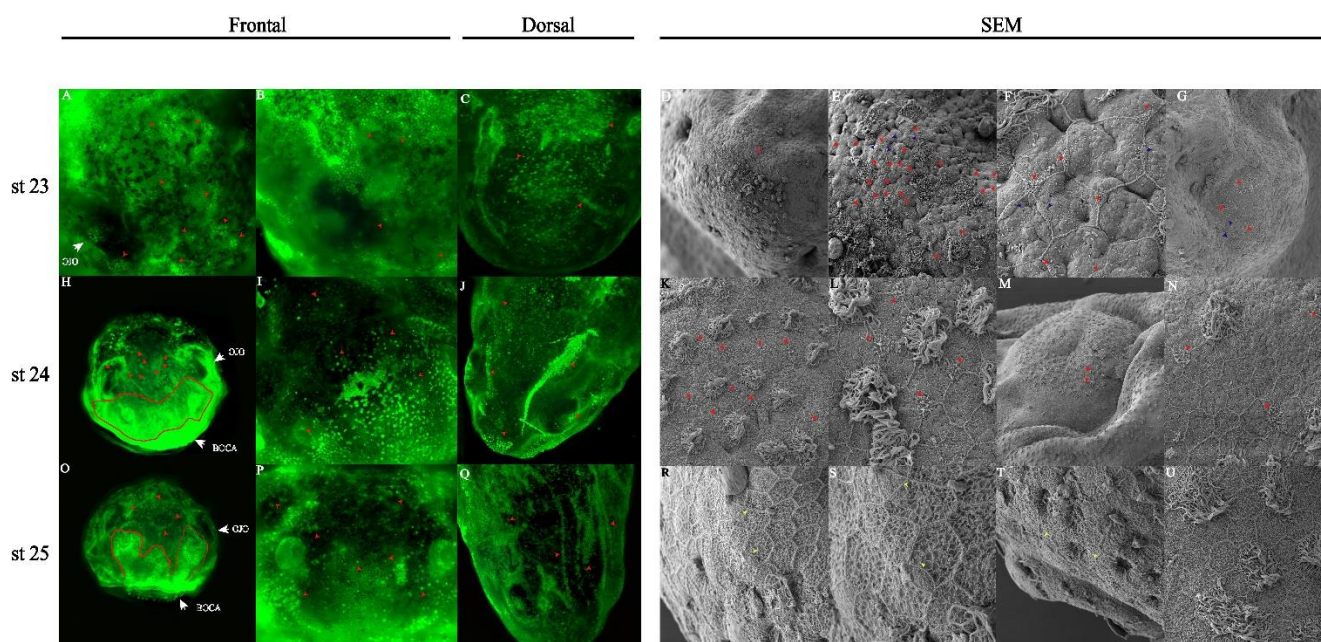
2435.2009.01678.x

- Touchon, J. C., Urbina, J., & Warkentin, K. M. (2011). Habitat-specific constraints on induced hatching in a treefrog with reproductive mode plasticity. *Behavioral Ecology*, 22, 169-175.
- Via, S., & Lande, R. (1985). Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution*, 39(3), 505–522. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00391.x>
- Warkentin, K. M. (1995). Adaptive plasticity in hatching age: a response to predation risk trade-offs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(8), 3507-3510. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3507>
- Warkentin, K. M. (2007). Oxygen, gills, and embryo behavior: Mechanisms of adaptive plasticity in hatching. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 148(4), 720-731. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.02.009>
- Warkentin, K. M. (2011a). Environmentally cued hatching across taxa: Embryos respond to risk and opportunity. *Integrative and Comparative Biology*, 51(1), 14–25. <https://doi.org/10.1093/icb/icr017>
- Warkentin, K. M. (2011b). Plasticity of hatching in amphibians: Evolution, trade-offs, cues and mechanisms. *Integrative and Comparative Biology*, 51(1), 111–127. <https://doi.org/10.1093/icb/icr046>.
- Warkentin, K. M. (2011). Plasticity of hatching in amphibians: Evolution, trade-offs, cues and mechanisms. *Integrative and Comparative Biology*, 51(1), 111-127. <https://doi.org/10.1093/icb/icr046>
- Warkentin, K. M., Cuccaro Diaz, J., Güell, B. A., Jung, J., Kim, S. J., & Cohen, K. L. (2017). Developmental onset of escape-hatching responses in red-eyed treefrogs depends on cue type. *Animal Behaviour*, 129, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2017.05.008>.
- Yamagami, K. (1988). Mechanisms of hatching in fish. In W.S. Hoar & D.J. Randall (Eds.), *Fish Physiology*, Vol. XI (pp. 447-499). San Diego: Academic Press.
- Yamasaki, H., Katagiri, C., & Yoshizaki, N. (1990). Selective Degradation of Specific Components of Fertilization Coat and Differentiation of Hatching Gland Cells during the Two Phase Hatching of *Bufo japonicus* Embryos: Toad/hatching gland cell/fertilization coat hydrolysis/hatching medium. *Development, Growth & Differentiation*, 32(1), 65–72. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1990.00065.x>
- Yoshizaki, N., & Katagiri, C. (1975). Cellular basis for the production and secretion of the hatching enzyme by frog embryos. *Journal of Experimental Zoology, Part A: Comparative Experimental Biology*, 192, 203–212.
- Yoshizaki, N. (1978). Disintegration of the vitelline coat during the hatching process in the frog. *Journal of Experimental Zoology, Part A: Comparative Experimental Biology*, 203, 127–133.
- Yoshizaki, N., & Yamamoto, M. (1979). A stereoscan study of the development of hatching gland cells in the embryonic epidermis of *Rana japonica*. *Acta Embryologicae Experimentalis*, 339-348.

Yoshizaki, N., & Yamasaki, H. (1991). Morphological and biochemical changes in the fertilization coat of *Xenopus laevis* during the hatching process. *Zoological Science*, 8, 303-308.

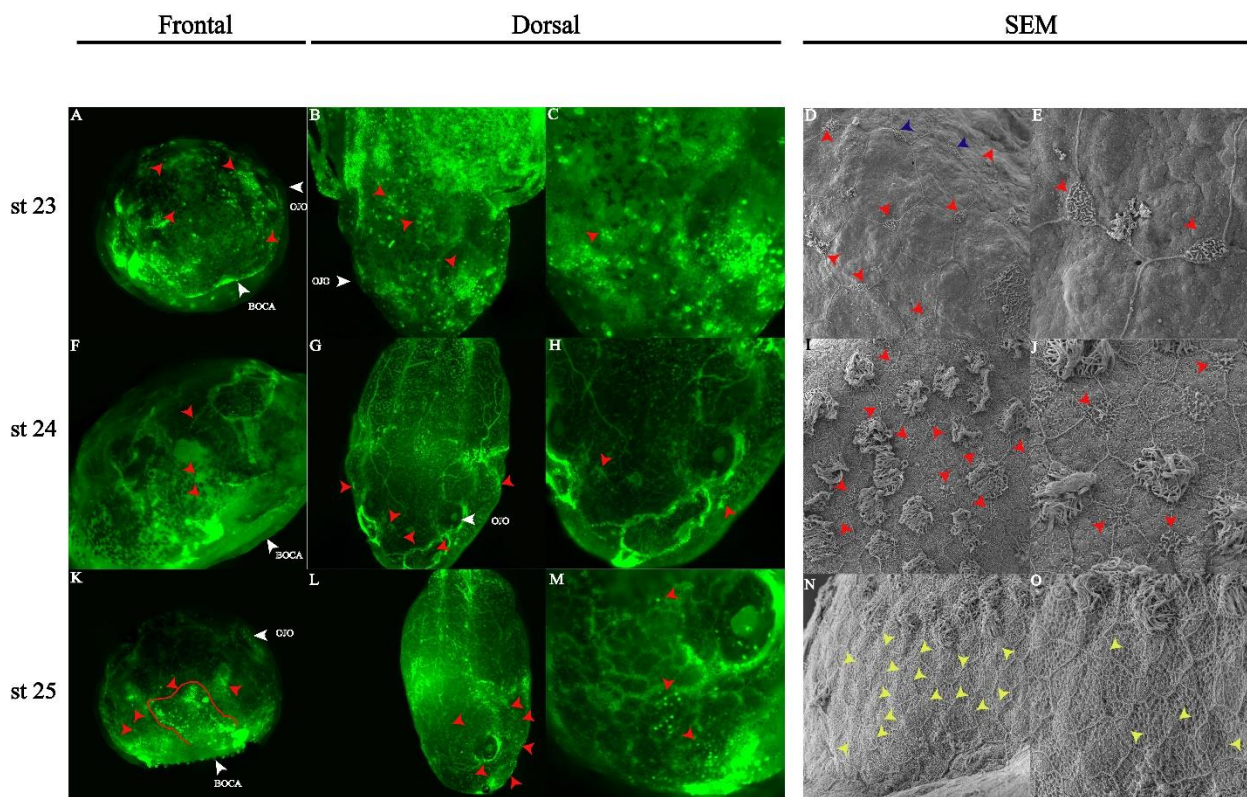
Zurita Paredes, D. E. (2020). Caracterización del mecanismo de eclosión y la eclosión por estímulo en *Hyloxalus nexipus* y *Epipedobates tricolor* (Bachelor's thesis, PUCE-Quito).

## 12. FIGURAS



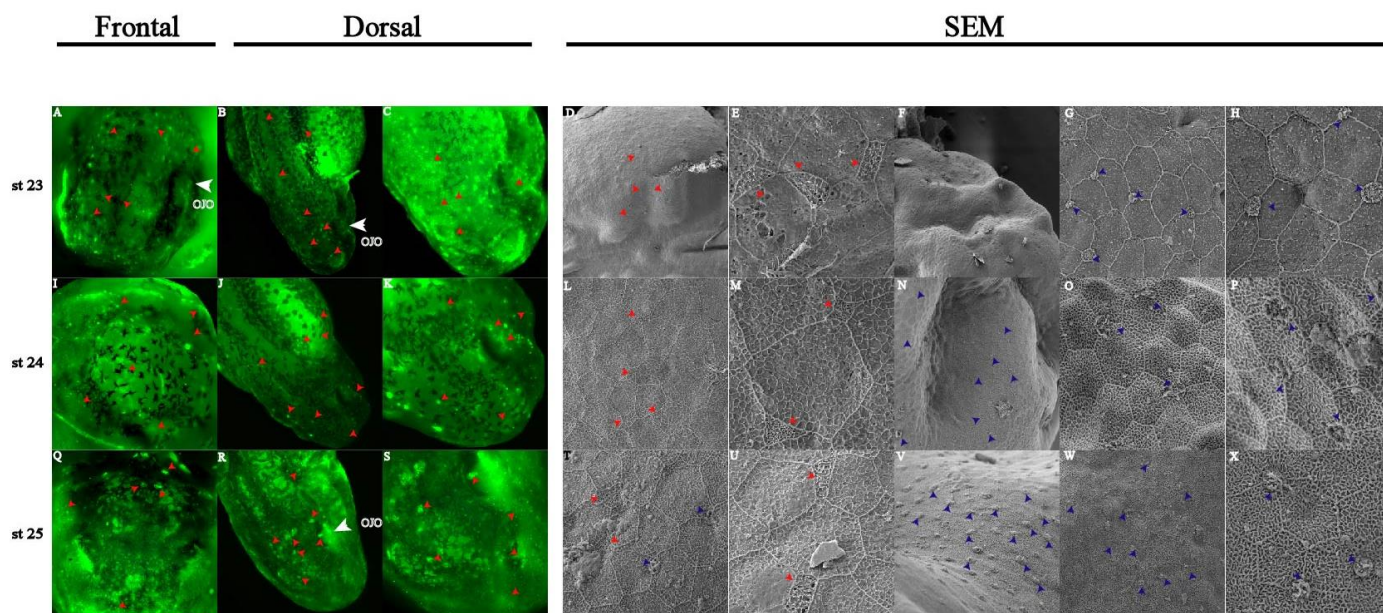
**Figura 1. Inmunohistoquímica y Microscopia Electrónica de Barrido de glándulas de eclosión (HGC) en *Epipedobates anthonyi*, estadios (st) 23, 24 y 25.** (A, H, O) Vista frontal de embriones en estadios 23, 24 y 25 respectivamente, con tinción para enzima de eclosión (HE), las flechas y líneas rojas indican la presencia de glándulas o conjunto de glándulas distribuidas especialmente alrededor de ojos y narinas. (B, I, P) Acercamiento frontal a células con tinción para HE. (C, J, Q) Vista dorsal de los embriones con tinción para HE (C) Estadio 23, varias células del dorso marcadas para HE. (J) Estadio 24, células marcadas en el dorso, acumulación de células a lo largo de la línea media dorsal y cerca del hocico. (Q) Estadio 25, células marcadas en forma de líneas marcadas a ambos lados de la línea media dorsal y en el medio un parche de células

marcadas, también estas células se marcan a los laterales del embrión. (D, E, F, G, K, L, M, N R, S, T, U) SEM de las HGC en parte dorso-frontal de los embriones. (D-G) Estadio 23, HGC con formas triangulares, cuadradas y poligonales se observaron microvellosidades que se proyectan de las glándulas, además de glándulas elipsoides con microvellosidades más pequeñas señaladas con flechas azules. (D) Zona entre narinas. (E) Acercamiento a la zona entre narinas. (F) Acercamiento a zona entre narina-ojo. (G) Acercamiento al ojo. (K-N) Estadio 24, zona dorso-frontal, glándulas con formas mayormente con formas triangulares y poligonales. (R-U) Estadio 25, las flechas amarillas señalan glándulas con formas poligonales, triangulares, elipsoides casi sin microvilli. (T-U) Zona lateral-frontal, hay poca presencia de glándulas. Las flechas blancas señalan partes del embrión, ojos y boca.



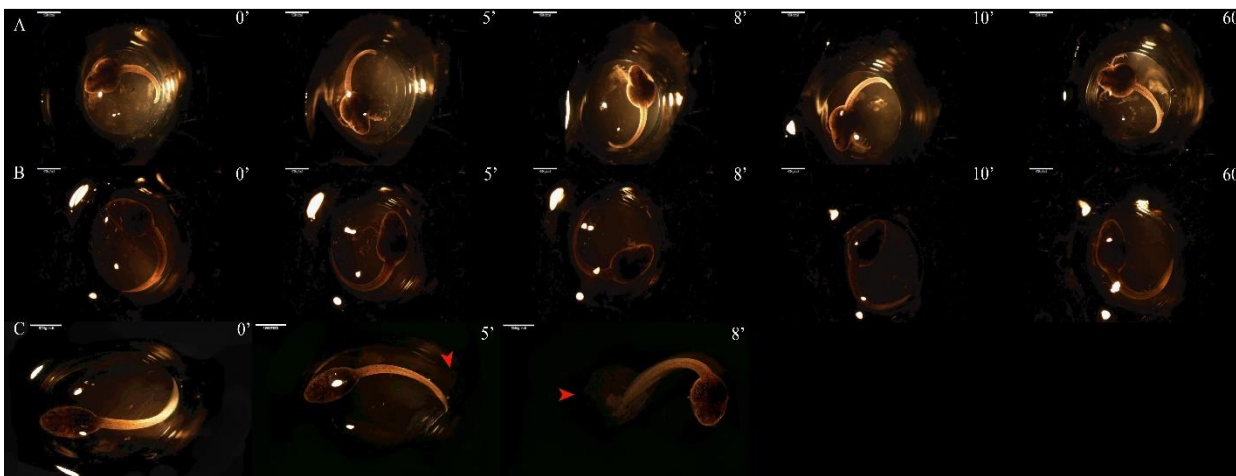
**Figura 2. Inmunohistoquímica y Microscopía Electrónica de Barrido de glándulas de ecdosis (HGC) en *Hyloxalus awa*, estadios (st) 23, 24 y 25. (A-M) Embriones de *H. awa* con**

tinción para enzima de eclosión (HE). (A, F, K) Vista frontal; (B, G, L) Vista dorsal en estadios 23, 24 y 25 respectivamente. Flechas y líneas rojas señalan conjunto de células marcadas para HE. (C, H, M) Acercamiento a las células marcadas para HE en la parte dorsal. (A-C) Estadio 23, presencia de células con tinción para HE ubicadas alrededor, en y entre los ojos; alrededor y entre de las narinas; pocas células marcadas en la zona entre narinas y boca. (B) Aglomeración de células marcadas para HE en ojos, cabeza y dorso. (C) Acercamiento a las células del dorso teñidas para HE. (F-H) Estadio 24, células marcadas en el contorno de los ojos, narinas, en la zona entre narinas y boca. (G) Algunas células marcadas a los costados del embrión. (H) Acercamiento a glándulas situadas cerca de los ojos. (K-M) Estadio 25, HGC marcadas en la zona entre narinas y boca, en el contorno y parte baja del ojo. (L) Pocas células marcadas en el dorso. (D, E, I, J N,O) SEM de glándulas de eclosión distribuidas en la parte dorsal-frontal de los embriones. (D-E) Glándulas de eclosión en la parte anterior de la cabeza con formas poligonales triangulares y elipsoides con proyecciones de microvellosidades, HGC con forma elipsoide y microvellosidades muy cortas señaladas con flechas azules. (I-J) Estadio 24, glándulas de eclosión en la cabeza, con formas triangulares y poligonales que proyectan microvellosidades. (N-O) Estadio 25, glándulas de eclosión en el contorno de la narina, formas poligonales, triangulares y elipsoides sin microvilli.



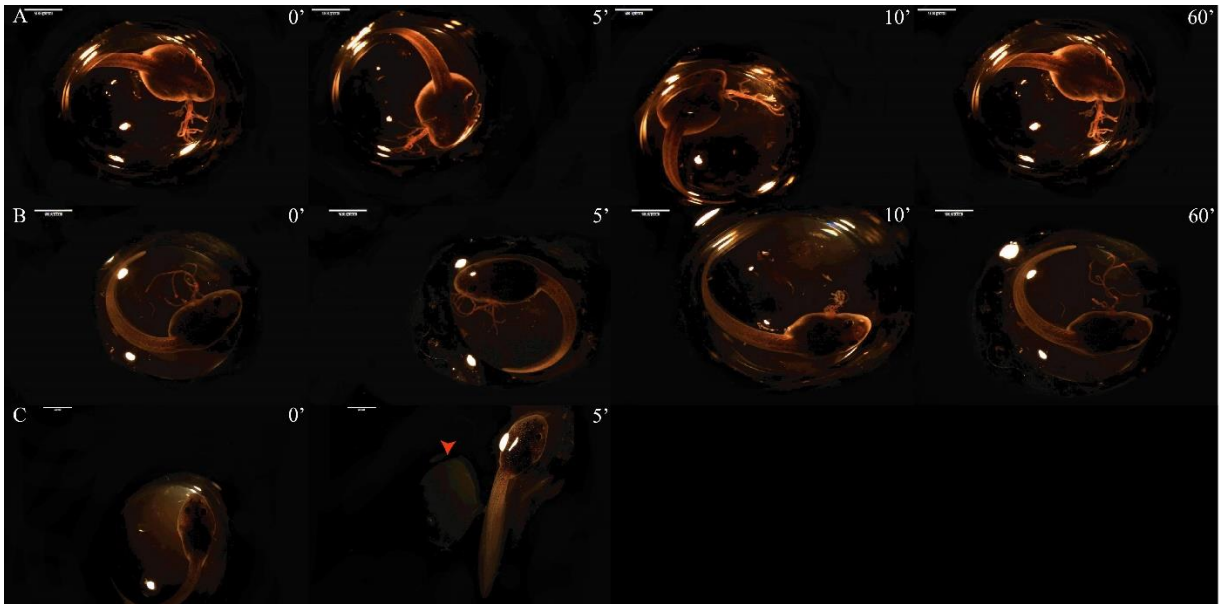
**Figura 3. Inmunohistoquímica y Microscopía Electrónica de Barrido de las glándulas de eclosión (HGC) en *Espadarana prosoblepon* en estadios (st) 23, 24 y 25.** (A-S) Embriones de *E. prosoblepon* con tinción para enzima de eclosión (HE). (A, I, Q) Vista frontal; (B, J, R) Vista dorsal en estadios (st) 23, 24 y 25 respectivamente. Flechas rojas indican las zonas marcadas por la tinción para enzima de eclosión. (A, B) Estadio 23, células marcadas en la parte frontal, alrededor de los ojos, narinas, parte posterior de la cabeza, dorso y la parte lateral del embrión cercano a la yema. (C) Acercamiento a las células con tinción HE. (I) Estadio 24, células marcadas con HE en la zona frontal, en el medio y el contorno de los ojos. (J) Células marcadas en la cabeza, dorso y lateral del embrión. (K) Acercamiento a las células marcadas para HE en el contorno de los ojos, costados de la cara del embrión y alrededor de la narina. (Q) Estadio 25, células marcadas alrededor, los costados y bajo las narinas (cerca a la boca) y en la zona entre ojos y narinas. (R) Células marcadas en la cabeza, dorso y lateral del embrión. (S) Acercamiento a las células marcadas alrededor de ojos y narinas. (D, E, F, G, H, L, M, N, O, P, T, U, V, W, X) SEM de las glándulas de eclosión en el dorso y cabeza. (D-H) Estadio 23; (D) Presencia de glándulas de eclosión en la parte dorsal que cubre la yema del embrión. (E)

Acercamiento a las glándulas de eclosión de forma triangular, cuadrada y rectangular con microvellosidades cortas, señaladas con flechas rojas. (F-H) Glándulas de eclosión en la cabeza, todas con forma circular y microvellosidades que se proyectan fuera de las células, señaladas con flechas azules. (L-P) Estadio 24; (L-M) Glándulas de eclosión en el dorso con formas poligonales, rectangulares, cuadradas y triangulares y microvellosidades cortas. (N-P) Glándulas de eclosión en la parte cabeza, cerca de los ojos, todas tiene forma redonda con microvellosidades que se proyecta de ellas. (T-X) Estadio 25; (T) glándulas de eclosión en la parte posterior de la cabeza, cerca al ojo, con formas triangulares, poligonales con microvellosidades cortas, señaladas con flechas rojas y glándulas redondas que proyectan microvellosidades, señaladas con flechas azules. (U) Glándulas de eclosión en el dorso, con forma rectangular y microvellosidades cortas. (V-X) Glándulas de eclosión de la parte anterior de la cabeza, en la zona de las narinas, todas son redondas con proyecciones de microvellosidades.

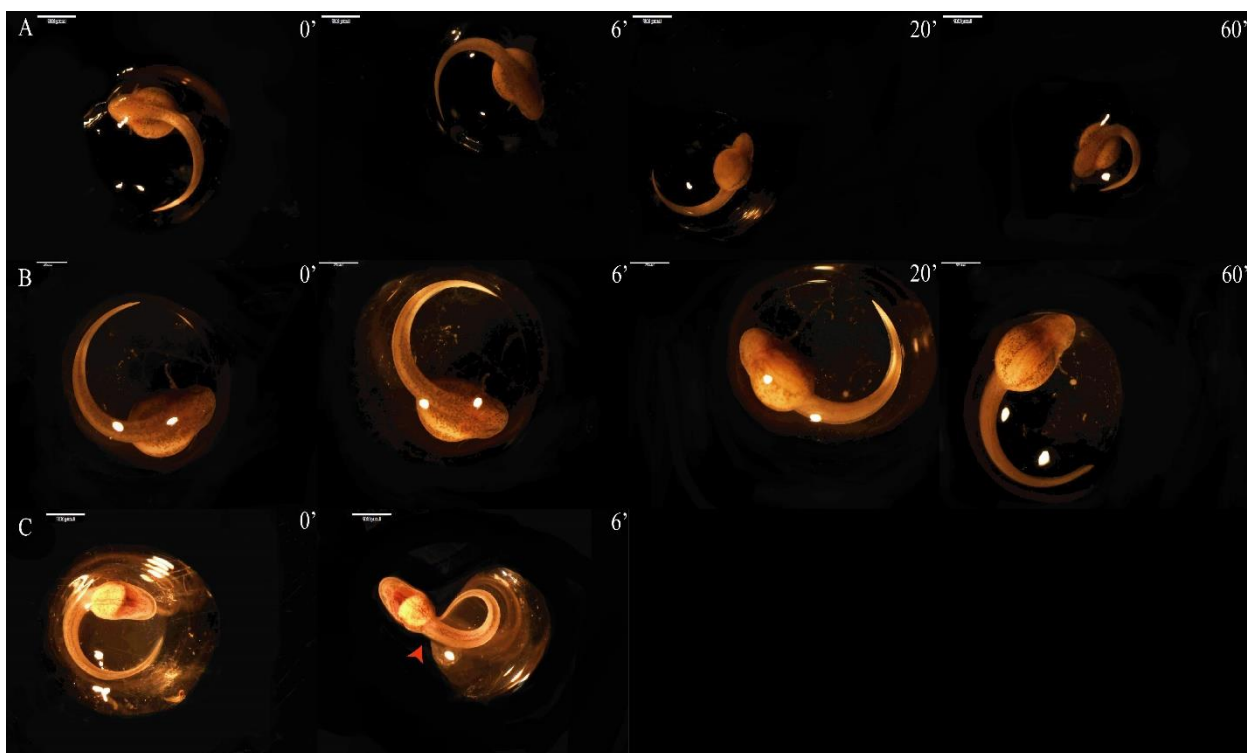


**Figura 4. Eclosión por estímulo en *Epipedobates anthonyi*.** (A, B, C) Embriones en estadio 23, 24, 25 respectivamente. (A, B) Estímulo aplicado durante 60 minutos, no hay eclosión en estadio 23. (C) La eclosión por estímulo en estadio 25 en la imagen ocurre a los 8

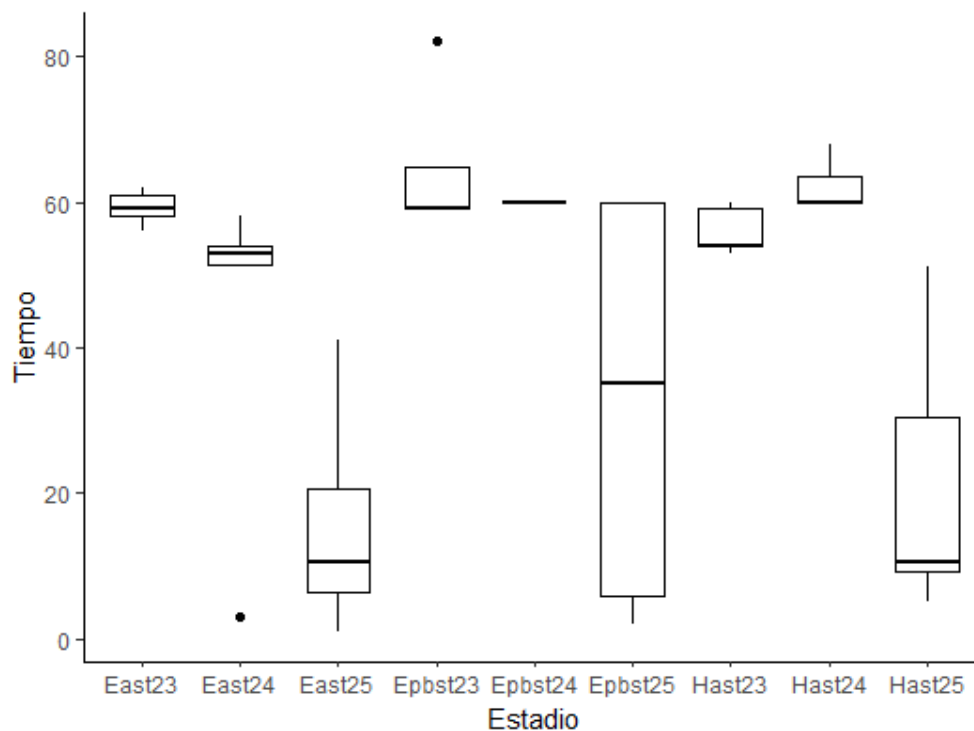
minutos, aproximadamente a los 5 minutos se observa la formación de la burbuja de eclosión, señalado por la flecha roja.



**Figura 5. Eclosión por estímulo en *Hyloxalus awa*.** (A, B, C) Embriones en estadio 23, 24 y 25 respectivamente. (A, B) En los estadios 23 y 24 no hay eclosión por estímulo durante 60 minutos. (C) En el estadio 25 de la imagen ocurre la eclosión por estímulo a los 5 minutos. Se forma la burbuja de eclosión (no mostrada en la imagen).



**Figura 6. Eclosión por estímulo en *Espadarana prosoblepon*.** (A, B, C) Embriones en estadios 23, 24 y 25 respectivamente. (A, B) No hay eclosión por estímulo durante 60 minutos en los estadios 23 y 24. (C) En la imagen la eclosión por estímulo ocurre a los seis minutos en el estadio 25, la flecha roja señala la cabeza del embrión fuera de la membrana vitelina, no se observa formación de burbuja de eclosión.



**Figura 7. Eclosión por estímulo de *Hyloxalus awa*, *Epipedobates anthonyi* y *Espadarna prosoblepon*.** Comparación del tiempo en el que ocurre la eclosión por estímulo. En las tres especies no ocurre eclosión por estímulo en estadio 23 hasta alrededor de los 60 minutos en los que se aplicó el estímulo, para un individuo de *E. prosoblepon* se aplicó el estímulo hasta los 82 minutos, lo que muestra en la figura como valor atípico. *E. anthonyi* es la única especie que presenta eclosión por estímulo en estadio 24. La eclosión por estímulo ocurre con mayor frecuencia en estadio 25 para las tres especies, aunque cada una tiene diferente variación de tiempo, *E. prosoblepon* es la especie en la que más varía el tiempo de eclosión, con individuos que eclosionaron a los dos minutos y otros en los que no hubo eclosión hasta los 60 minutos que duró el estímulo. Eje X, individuos de: Ea (*Epipedobates anthonyi*); Epb (*Espadarna prosoblepon*); Ha (*Hyloxalus awa*); st23, 24, 25 (estadio 23, 24, 25). Eje Y, tiempo en minutos.