

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Desarrollo temprano de *Hyalinobatrachium fleischmanni* y *Espadarana callistomma* (Anura: Centrolenidae) desde el clivaje hasta la eclosión del renacuajo.

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

MARÍA JOSÉ SALAZAR NICHOLLS

2013

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata María José Salazar Nicholls ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Eugenia M. del Pino V.

Directora de la Disertación

Quito, 22 de mayo del 2013

*A mi madre*

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre por siempre estar junto a mí, por ser mi guía, mi amiga, mis fuerzas. Por su esfuerzo, sacrificio y amor infinito. Por enseñarme que se puede salir adelante a pesar de las adversidades. Por jamás rendirse, por luchar por su vida y sus hijos. A mis hermanos que son mi apoyo y mi ejemplo. En especial a mi abuelo, quien fue un padre para mí.

Agradezco especialmente a la Doctora Eugenia del Pino, por su apoyo y guía profesional durante este trabajo. Además por su preocupación constante y comprensión en los momentos difíciles.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por la beca de investigación otorgada a la Dra. Eugenia del Pino. Al Centro de Investigación y Conservación de Anfibios (CICA), por la donación de los embriones utilizados en este estudio.

Además quiero agradecer a todos los miembros del Laboratorio de Biología del Desarrollo, por su ayuda y amistad. A Natalia, Francisca y Angelita. En especial a Alexandra y Andrés por la inmensa ayuda y colaboración a lo largo de este trabajo.

A Esteban gracias por tu amor, paciencia y apoyo incondicional. A Diana, Camila, Ricardo, Pablo, Silvia, Lucas, Jorge; quienes de una u otra forma hicieron de mi vida universitaria un lugar divertido y lleno de buenos momentos.

Finalmente, a todos quienes han influido en mí para hacerme una mejor persona y han formado parte de mi vida.

**TABLA DE CONTENIDOS**

1. RESUMEN .....	17
2. ABSTRACT .....	19
3. INTRODUCCIÓN .....	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
4.1 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE LOS EMBRIONES .....	36
4.2 PROCESAMIENTO Y FIJACIÓN DE LOS EMBRIONES .....	36
4.2.1 SOLUCIONES Y FIJATIVOS .....	36
4.2.1.1. SOLUCIÓN DE STEINBERG (Rugh, 1965) .....	36
4.2.1.2. SOLUCIÓN SALINA TAMPÓN FOSFATO (PBS).....	37
4.2.1.3. FORMALINA 10 % .....	37
4.2.1.4. FIJATIVO SMITH.....	37
4.2.1.5. GELATINA 7,5% .....	38
4.2.1.6. AGAROSA 6% .....	38
4.2.2 PROCESAMIENTO DE LOS EMBRIONES .....	38
4.2.3 FIJACIÓN DE EMBRIONES .....	39
4.2.3.1 FIJACIÓN CON SMITH .....	39
4.3 OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LOS EMBRIONES. ....	40
4.3.1 BISECCIONES .....	40

4.3.2 SECCIONES EN VIBRATOME.....	40
4.3.3. TINCIÓN FLUORESCENTE PARA NÚCLEOS CON HOECHST 33258 .....	41
4.4 FOTOGRAFÍA DE EMBRIONES ENTEROS, BISECCIONES, SECCIONES Y PLACAS.....	42
5. RESULTADOS .....	43
5.1 EL DESARROLLO TEMPRANO DE <i>H. fleischmanni</i> Y <i>E. callistomma</i> . .....	43
5.2 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LOS EMBRIONES DE <i>H.</i> <i>fleischmanni</i> Y <i>E. callistomma</i> .....	44
5.2.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LOS EMBRIONES DE <i>H. fleischmanni</i> . .....	44
5.2.1.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL EMBRIÓN EN ESTADIO DE 32 CÉLULAS (ESTADIO 6) DE <i>H. fleischmanni</i> . .....	44
5.2.1.2 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA BLÁSTULA DE CÉLULAS GRANDES (ESTADIO 7) DE <i>H. fleischmanni</i> . .....	45
5.2.1.3 MORFOLOGÍA DE LA BLÁSTULA DE CÉLULAS MEDIANAS (ESTADIO 8) DE <i>H. fleischmanni</i> . .....	45
5.2.1.4 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA. ESTADIO: LABIO DORSAL DEL BLASTOPORO (ESTADIO 10) DE <i>H. fleischmanni</i> . .....	46
5.2.1.5 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA (ESTADIO 11) DE <i>H. fleischmanni</i> . .....	47

5.2.1.6 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA MEDIA. EMBRIÓN CON TAPÓN DE YEMA MEDIANO (ESTADIO 12) DE <i>H. fleischmanni</i> . .....	47
5.2.1.7 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TARDÍA. EMBRIÓN CON TAPÓN DE YEMA PEQUEÑO (ESTADIO 12.5) DE <i>H. fleischmanni</i> . .....	48
5.2.1.8 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA POST-GÁSTRULA. (ESTADIO 13) DE <i>H. fleischmanni</i> . .....	49
5.2.1.9 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA TEMPRANA. (ESTADIO 14) DE <i>H. fleischmanni</i> . .....	50
5.2.1.10 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA MEDIA. (ESTADIO 15) DE <i>H. fleischmanni</i> . .....	51
5.2.1.11 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA TARDÍA. (ESTADIO 16) DE <i>H. fleischmanni</i> . .....	51
5.2.1.12 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE YEMA DE LA COLA. (ESTADIO 17) DE <i>H. fleischmanni</i> . .....	52
5.2.1.13 MORFOLOGÍA DEL ESTADIO DE DESARROLLO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 21) Y DEL ESTADIO DE DESARROLLO COMPLETO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 23) DE <i>H. fleischmanni</i> . .....	52
5.2.1.14 MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN A LA ECLOSIÓN (ESTADIO 25) DE <i>H. fleischmanni</i> . .....	53
5.2.2 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LOS EMBRIONES DE <i>E. callistomma</i> . .....	53

5.2.2.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL EMBRIÓN EN ESTADIO DE 32 CÉLULAS (ESTADIO 6) DE <i>E. callistomma</i> .	53
5.2.2.2 MORFOLOGÍA DE LA BLÁSTULA DE CÉLULAS MEDIANAS (ESTADIO 8) DE <i>E. callistomma</i> .	54
5.2.2.3 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA. ESTADIO: LABIO DORSAL DEL BLASTOPORO (ESTADIO 10) DE <i>E. callistomma</i> .	55
5.2.2.4 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA (ESTADIO 11) DE <i>E. callistomma</i> .	55
5.2.2.5 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA MEDIA. EMBRIÓN CON TAPÓN DE YEMA MEDIANO (ESTADIO 12) DE <i>E. callistomma</i> .	56
5.2.2.6 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TARDÍA. EMBRIÓN CON TAPÓN DE YEMA PEQUEÑO (ESTADIO 12.5) DE <i>E. callistomma</i> .	57
5.2.2.7 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA POST-GÁSTRULA (ESTADIO 13) DE <i>E. callistomma</i> .	57
5.2.2.8 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA TEMPRANA (ESTADIO 14) DE <i>E. callistomma</i> .	58
5.2.2.9 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA MEDIA (ESTADIO 15) DE <i>E. callistomma</i> .	59
5.2.2.10 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA TARDÍA (ESTADIO 16.5) DE <i>E. callistomma</i> .	59

5.2.2.11 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE YEMA DE LA COLA (ESTADIO 17) DE <i>E. callistomma</i> .	60
5.2.2.12 MORFOLOGÍA DEL ESTADIO DE RESPUESTA MUSCULAR (ESTADIO 18) DE <i>E. callistomma</i> .	60
5.2.2.13 MORFOLOGÍA DEL ESTADIO DE YEMA DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 19) DE <i>E. callistomma</i> .	61
5.2.2.14 MORFOLOGÍA DE LOS ESTADIOS DE DESARROLLO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 20 Y ESTADIO 21) DE <i>E. callistomma</i> .	61
5.2.2.15 MORFOLOGÍA DEL ESTADIO DE DESARROLLO COMPLETO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 23) DE <i>E. callistomma</i> .	62
5.2.2.16 MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN A LA ECLOSIÓN (ESTADIO 25) DE <i>E. callistomma</i> .	62
6. DISCUSIÓN.	64
6.1. EL DESARROLLO TEMPRANO DE <i>H. fleischmanni</i> Y <i>E. callistomma</i> .	65
6.1.1. MORFOLOGÍA DEL CLIVAJE Y BLÁSTULA DE <i>H. fleischmanni</i> Y <i>E. callistomma</i> .	65
6.1.2 MORFOLOGÍA DE GÁSTRULA Y MODO DE GASTRULACIÓN DE <i>H. fleischmanni</i> Y <i>E. callistomma</i> .	66
6.1.3 MORFOLOGÍA DE LA NÉURULA DE <i>H. fleischmanni</i> Y <i>E. callistomma</i> .	69
6.1.3.1. PRESENCIA DE GRP EN LA NÉURULA DE <i>H. fleischmanni</i> Y <i>E. callistomma</i> .	70

6.1.4 MORFOLOGÍA DE LOS EMBRIONES DE <i>H. fleischmanni</i> Y <i>E. callistomma</i> DESDE EL ESTADIO DE YEMA DE LA COLA (ESTADIO 17) HASTA LA ECLOSIÓN DEL RENACUAJO (ESTADIO 25).....	71
6.2 PIGMENTACIÓN DEL HUEVO Y TIEMPOS DEL DESARROLLO TEMPRANO DE <i>H. fleischmanni</i> Y <i>E. callistomma</i> . .....	72
6.3 LA IMPORTANCIA DE LA MODULARIDAD EN EL DESARROLLO TEMPRANO DE RANAS CON DISTINTAS ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS. ....	74
6.4. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA DE LOS EMBRIONES DE <i>H. fleischmanni</i> Y <i>E. callistomma</i> .....	76
7. LITERATURA CITADA.....	78
8. FIGURAS.....	88
9. TABLAS .....	155
10. ANEXOS.....	166

## LISTA DE FIGURAS

Figura. 1. Resumen del desarrollo temprano de <i>H. fleischmanni</i> y <i>E. callistomma</i> .....	90
Figura. 2. Morfología del estadio de 32 células de <i>H. fleischmanni</i> (estadio 6).....	92
Figura. 3. Morfología del estadio de blástula de células grandes de <i>H. fleischmanni</i> (estadio 7) .....	94
Figura. 4. Morfología del estadio de blástula de células medianas de <i>H. fleischmanni</i> (estadio 8) .....	96
Figura. 5. Morfología de la gástrula temprana de <i>H. fleischmanni</i> (estadio 10).....	97
Figura. 6. Morfología de la gástrula temprana de <i>H. fleischmanni</i> (estadio 11).....	99
Figura. 7. Morfología de la gástrula media de <i>H. fleischmanni</i> (estadio 12).....	101
Figura. 8. Morfología de la gástrula tardía de <i>H. fleischmanni</i> (estadio 12.5).....	103
Figura. 9. Secciones transversales de embriones en estadio de gástrula tardía de <i>H. fleischmanni</i> (estadio 12.5) .....	105
Figura. 10. Morfología de la post-gástrula de <i>H. fleischmanni</i> (estadio 13).....	107
Figura. 11. Morfología del estadio de post-gástrula de <i>H. fleischmanni</i> en vistas externa e interna (estadio 13).....	109
Figura. 12. Morfología de la néurula temprana de <i>H. fleischmanni</i> (estadio 14) .....	111
Figura. 13. Morfología de la néurula media de <i>H. fleischmanni</i> (estadio 15).....	113

Figura. 14. Morfología de la néurula tardía de <i>H. fleischmanni</i> (estadio 16) .....	115
Figura. 15. Morfología del estadio de yema de la cola de <i>H. fleischmanni</i> (estadio 17).....	117
Figura. 16. Morfología del estadio de desarrollo de las branquias y del estadio de desarrollo completo de las branquias de <i>H. fleischmanni</i> (estadio 21 y 23).....	119
Figura. 17. Morfología de los embriones a la eclosión de <i>H. fleischmanni</i> (estadio 25).....	121
Figura. 18. Morfología del estadio de 32 células <i>E. callistomma</i> (estadio 6).....	123
Figura. 19. Morfología de la blástula de células medianas <i>E. callistomma</i> (estadio 8).....	125
Figura. 20. Morfología de la gástrula temprana de <i>E. callistomma</i> (estadio 10).....	127
Figura. 21. Morfología de la gástrula temprana de <i>E. callistomma</i> (estadio 11).....	129
Figura. 22. Morfología de la gástrula media de <i>E. callistomma</i> (estadio 12).....	131
Figura. 23. Morfología de la gástrula tardía de <i>E. callistomma</i> (estadio 12.5).....	133
Figura. 24. Morfología de la post-gástrula de <i>E. callistomma</i> (estadio 13).....	135
Figura. 25. Morfología del estadio de post-gástrula de <i>E. callistomma</i> en vistas externa e interna (estadio 13).....	137
Figura. 26. Morfología de la néurula temprana de <i>E. callistomma</i> (estadio 14).....	139
Figura. 27. Morfología de la néurula media de <i>E. callistomma</i> (estadio 15).....	141
Figura. 28. Morfología de la néurula tardía de <i>E. callistomma</i> (estadio 16.5).....	143

Figura. 29. Morfología del estadio de yema de la cola de <i>E. callistomma</i> (estadio 17) .....	145
Figura. 30. Morfología del estadio de respuesta muscular y del estadio de yema de las branquias de <i>E. callistomma</i> (estadio 18 y 19) .....	147
Figura. 31. Morfología de embriones en estadios de desarrollo de las branquias de <i>E.</i> <i>callistomma</i> (estadio 20 y 21) .....	149
Figura. 32. Morfología del estadio de desarrollo completo de las branquias de <i>E. callistomma</i> (estadio 23).....	151
Figura. 33. Morfología de los embriones a la eclosión de <i>E. callistomma</i> (estadio 25) .....	153

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Tiempo del desarrollo, en horas y minutos, de los embriones de <i>H. fleischmanni</i> en cada postura. El tiempo 00:00 es el inicio de las observaciones.....	156
Tabla 2. Tiempo del desarrollo, en horas y minutos, de los embriones de <i>E. callistomma</i> en cada postura. El tiempo 00:00 es el inicio de las observaciones.....	157
Tabla 3. Estadios del desarrollo de <i>H. fleischmanni</i> y <i>E. callistomma</i> en relación a la tabla de desarrollo de <i>Xenopus laevis</i> (Nieuwkoop y Faber, 1994) y la tabla general de Gosner (1960). .....	158
Tabla 4. Tiempos de gastrulación. En horas y minutos, de los embriones de <i>H. fleischmanni</i> y <i>E. callistomma</i> . El tiempo 00:00 es el inicio de la gastrulación. ....	160
Tabla 5. Lista de fotografías y créditos .....	161

**LISTA DE ANEXOS**

Anexo 1. Movimiento de los tejidos durante la gastrulación en <i>Xenopus</i> .....	167
Anexo 2. Patrones de Gastrulación .....	168
Anexo 3. Morfología de la formación del tubo neural.....	169

## 1. RESUMEN

El presente estudio describe y analiza el desarrollo embrionario, desde el clivaje hasta la eclosión de los renacuajos en dos ranas de la familia Centrolenidae, *Hyalinobatrachium fleischmanni* y *Espadarana callistomma*. Estas ranas se caracterizan por depositar sus huevos (2,1 mm de diámetro) en masas gelatinosas en hojas sobre corrientes de agua. Las especies presentan diferencias en la pigmentación del huevo. Los huevos de *H. fleischmanni* son blancos y son depositados en el envés de las hojas donde no están expuestos a la radiación UV, mientras que los huevos de *Espadarana callistomma* tienen una pigmentación marrón en el hemisferio animal y son depositados en el haz de las hojas donde están expuestos a la radiación UV. La diferencia en la pigmentación de los huevos entre las especies podría ser analizada mediante el estudio de la expresión de *Shroom2* en los oocitos de estas especies. La morfología de los embriones fue evaluada en montajes enteros, bisecciones, secciones de vibrátomo y con tinción fluorescente para núcleos celulares. El desarrollo temprano de estas especies fue dividido en 25 estadios, utilizando los estadios previamente propuestos en las tablas de *X. laevis* y general para el desarrollo de anfibios de Gosner (1960). La morfología del clivaje, gastrulación y neurulación se asemejan al patrón de desarrollo de *X. laevis*. Sin embargo, en estadios posteriores, los embriones de las ranas centrolénidas difieren de *X. laevis* en la forma que toman los embriones como en el estadio de yema de la cola. En estas especies, la elongación del arquenterón se inicia en la gástrula temprana y la elongación del notocordio se inicia en la gástrula tardía, lo que sugiere que estas especies comparten el mismo patrón de gastrulación con las especies de desarrollo rápido *X. laevis*, *E. coloradorum* y *E. randi*. La presencia de la placa del techo del arquenterón (GRP, por sus siglas en inglés) en la néurula de ambas especies

sugiere que en estas especies como en los anfibios antes analizados el GRP es una estructura conservada. Ésta es la primera descripción del desarrollo temprano de las ranas centrolénidas *Hyalinobatrachium fleischmanni* y *Espadarana callistomma*.

Palabras clave: Desarrollo embrionario, *Espadarana callistomma*, Gastrulación, *Hyalinobatrachium fleischmanni*, Placa del techo del arquenterón, *Xenopus laevis*.

## 2. ABSTRACT

This study describes and analyzes the embryonic development, from cleavage to tadpole hatching in two species of glass frogs, *Hyalinobatrachium fleischmanni* and *Espadarana callistomma* (Anura: Centrolenidae). These frogs are characterized by laying their eggs (2.1 mm in diameter) in gelatinous masses on leaves overhanging streams. These species have differences in egg pigmentation. The eggs of *H. fleischmanni* are white and are laid on the underside of leaves where they are not exposed to UV radiation. In contrast, the eggs of *E. callistomma* have a pigmented dark brown animal half, and a non-pigmented, yolkier vegetal half and the eggs of *E. callistomma* are laid over the leaves where they are exposed to UV radiation. The pigmentation difference in the eggs of *H. fleischmanni* y *E. callistomma* should be analyzed by the research about the *Shroom2* expression in oocytes of these species. Embryo morphology was evaluated in whole mounts, bisections, vibratome sections and fluorescent staining for cell nuclei. The early development of these species was divided into 25 stages, by using the previously proposed table for *X. laevis* and the generalized table of frog development of Gosner (1960). The morphology of cleavage, gastrulation and neurulation resembles the *X. laevis* development pattern. However, at later stages, embryos of glass frogs differ from *X. laevis* in the general shape. In *Hyalinobatrachium fleischmanni* and *Espadarana callistomma* the archenteron elongation begins in early gastrula and notochord elongation begins in late gastrula in a similar pattern as *X. laevis*, *E. coloradorum* and *E. randi* that have rapid development. The presence of the gastrocoel roof plate (GRP) in the neurula of both species suggests that in these species, as in the amphibians before analyzed, the GRP is a conserved

structure. This is the first description of the early development of the glass frogs *Hyalinobatrachium fleischmanni* and *Espadarana callistomma*.

Key words: Embryonic development, *Espadarana callistomma*, Gastrulation, Gastrocoel roof plate, *Hyalinobatrachium fleischmanni*, *Xenopus laevis*.

### 3. INTRODUCCIÓN

La variedad de estrategias de reproducción no sólo es evidencia de la larga historia filogenética de los anfibios (Elinson y del Pino, 2012; Duellman y Trueb, 1986) sino que, permite variaciones adaptativas en otro aspecto vinculado con la reproducción como es el desarrollo embrionario. En anuros el desarrollo embrionario ha sido estudiado y descrito sobre la base de organismo modelo *Xenopus laevis* (Gilbert, 2003). En *X. laevis* el clivaje es radialmente simétrico, inicialmente síncrono y holoblástico sin crecimiento celular. La tercera división holoblástica establece dos regiones: una región embrionaria de blastómeros animales pequeños (micrómeros) que se divide rápidamente y una región de blastómeros vegetales grandes (macrómeros) que se divide más lentamente (Beams y Kessel, 1976). El ciclo celular de los blastómeros tempranos en *X. laevis* es regulado por los niveles citoplasmáticos del factor promotor de la mitosis (revisado en Wolpert *et al.*, 2007). El resultado de las divisiones mitóticas durante el clivaje y del transporte de iones hacia el interior del embrión forma una cavidad llena de fluido ubicada en el polo animal, el blastocele.

El embrión de *X. laevis* se denomina blástula cuando el blastocele aparece. El fluido ejerce presión hidrostática sobre la pared del blastocele para mantener la forma esférica del embrión. Esta cavidad está limitada por las células del techo y las células del piso del blastocele, y se extiende conforme avanza el desarrollo (Warner, 1984). El blastocele tiene dos funciones principales en las ranas: Permite la migración celular durante la gastrulación y, evita el contacto de las células vegetales del piso del blastocele destinadas a convertirse en endodermo con las células del techo del blastocele de destino ectodermal que van a dar origen a la piel y al sistema nervioso (Gilbert, 2003). Durante el clivaje, numerosas moléculas de adhesión mantienen

unidos a los blastómeros. Una de las más importantes moléculas es la EP-cadherina. El mRNA para esta proteína es suministrado en el citoplasma del oocito. Los huevos de *X. laevis* contienen cantidades muy grandes de mRNAs maternos, que son depositados durante la oogénesis (Gilbert, 2003).

En el organismo modelo *X. laevis* sólo unos pocos genes son transcritos durante el clivaje temprano. La mayoría de los genes nucleares no son activados hasta el 12vo clivaje, periodo conocido como la transición de la blástula media (MBT, por sus siglas en inglés). En esta etapa se inicia la transcripción de los genes cigóticos, los ciclos celulares se vuelven asíncronos y los blastómeros adquieren la capacidad de volverse móviles (revisado por Zhang *et al.*, 1998; Newport y Kirschner, 1982).

En el estadio de blástula también se produce la inducción de las capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. El ectodermo prospectivo se localiza en el hemisferio animal y dará origen a la piel y al sistema nervioso. El mesodermo prospectivo se ubica en la zona marginal y formará el notocordio, los riñones, la sangre, los somitas y el corazón. El endodermo prospectivo se localiza en el hemisferio vegetal y dará origen al intestino (Yasuo y Lemaire, 2001). La inducción es un evento íntimamente ligado a los procesos morfogénicos de la gastrulación y a la generación de señales esenciales para el desarrollo embrionario (Symes y Smith, 1987). La inducción de las capas germinales se produce por la traducción de los mRNAs maternos que se establecen durante la oogénesis (Dale, 1999). El factor materno que determina el ectodermo es el E3 ubiquitin-ligasa ectodermin, que se traduce del mRNA materno localizado en el hemisferio animal. La función del ectodermin es limitar el efecto de las señales de la inducción del mesodermo. La inducción del mesodermo involucra cuatro distintas vías de señalización molecular y explica la forma en la cual el mesodermo se especifica y adquiere su

patrón dorso-ventral (Gilbert, 2003). La vía de inducción mesodermal primaria, que proviene de la región vegetal, utiliza a las señales *vegt*, *Nodal* (*Xenopus* Nodal-relates proteins o *Xnr* 's), *Derriere* y *Activin*, entre otros miembros de la familia TGB- $\beta$ . La segunda vía proviene del centro del Nieuwkoop, en la región vegetal-dorsal de la blástula, y se encarga de inducir al futuro organizador dorsal (Organizador de Spemann); este grupo de señales actúa mediante la vía canónica de señalización de Wnt (Heasman, 2006). Los siguientes dos tipos de señales se generan en el mesodermo inducido y establecen el patrón dorsal-ventral del mesodermo. Las proteínas provenientes del organizador de Spemann constituyen el tercer tipo de señales y poseen una acción dorsalizante (Wolpert *et al.*, 2007). Noggin, Chordin, Follistatin, Frizbee, Cerberus, entre otras proteínas del organizador, son capaces de autodiferenciar en mesodermo dorsal al tejido en el que son producidas y especificar las regiones laterales del organizador, el mesodermo paraxial. Estas señales también son capaces de iniciar los movimientos de involución, convergencia y extensión dorsales (Gilbert, 2003). El cuarto tipo de señales promueve la ventralización de mesodermo. La cuarta vía de señalización es activada por los transcritos maternos *BMP2* y *BMP7*, los cuales activan a *BMP4* y *Xwnt8* (Heasman, 2006). Los genes cigóticos *Brachyury*, *Eomesodermin* y *Antipodean*, entre otros, son los primeros genes mesodermales en expresarse y constituyen la respuesta más temprana a la inducción mesodermal (Heasman, 2006). El endodermo es maternalmente especificado en la región vegetal. El factor de transcripción *vegt* tiene un rol clave en la especificación del endodermo, este se traduce del mRNA materno en el hemisferio vegetal del huevo (Heasman, 2006).

En *X. laevis* las capas germinales prospectivas se mueven hacia sus posiciones espaciales definitivas durante la gastrulación. En la gastrulación, el embrión atraviesa por reordenamientos celulares dramáticos y complejos (Shook *et al.*, 2004) que ubican al ectodermo

en la superficie externa del embrión cubriéndolo por completo, al endodermo cubriendo la superficie interna y el mesodermo ubicándose entre ellos (Keller, 1996). Los dos principales objetivos de la gastrulación son el cerramiento del blastoporo y la formación del arquenteron. El cerramiento del blastoporo hace que el endodermo y mesodermo ingresen completamente al embrión (Ewald *et al.*, 2004). Los principales movimientos que permiten la gastrulación son la rotación vegetal (Winklbauer y Schürfeld, 1999), la involución, la epíbole y la convergencia y extensión dorsales. El proceso de gastrulación se inicia en el lado dorsal de la blástula, con la formación de las células de botella (revisado por Keller y Shook, 2004). Este evento se produce en el borde vegetal-dorsal de la zona marginal de involución (IMZ, por sus siglas en inglés), donde las células incurren en constricción apical formando un surco que dará origen al labio dorsal del blastoporo, que corresponde al organizador de Spemann (Wolpert *et al.*, 2007). En la involución, la IMZ se mueve hacia el interior y por lo tanto se internaliza el endomesodermo involucionando sobre el labio dorsal del blastoporo y alcanzando la región ventral para el estadio de gástrula media (Winklbauer y Schürfeld, 1999). La involución resulta en la formación de un surco entre el ectodermo y el endomesodermo denominado el “Cleft de Brachet” que impide que estas dos capas interactúen una con la otra (Gorny y Steinbeisser, 2012). Este movimiento masivo de la IMZ es iniciado y dirigido por los movimientos de rotación vegetal (Winklbauer y Schürfeld, 1999).

La epíbole es la intercalación de células ectodermales profundas con las células superficiales del ectodermo de tal manera que el ectodermo recubre a todo el embrión (Marsden y DeSimone, 2001). Tanto la involución como la epíbole ocurren al inicio de la gastrulación y se completan al final de esta (Myers *et al.*, 2002).

Los movimientos de convergencia y extensión dorsales se suman al proceso de gastrulación. Estos movimientos simultáneamente hacen que las células se acumulen en la región circumblastoporal y se alarguen en dirección antero- posterior (Myers *et al.*, 2002). Estos movimientos también cierran el blastoporo y contribuyen con la involución de la zona marginal. La convergencia encoge los labios del blastoporo hasta que los cierra, mientras que la extensión alarga las estructuras axiales y paraxiales y define el eje antero-posterior del cuerpo. La convergencia y extensión dorsales se dan primero en la región dorsal y más tarde en las regiones laterales. En la región ventral ocurre la convergencia y engrosamiento. El movimiento de convergencia y extensión dorsales hace que el endomesodermo ingrese por la región dorsal, para formar el techo del arquenterón alargado, las células en botella dorsales también son llevadas hacia adentro junto con el endomesodermo y son arrastradas anteriormente (Keller *et al.*, 1985). Las células de botella son nuevamente esparcidas al final del estadio de gástrula media, para ocupar gran área del revestimiento del arquenterón (Hardin y Keller, 1988).

El proceso de “reesparcimiento” de las células de botella es progresivo y ocurre en el mismo orden dorso-ventral en el que se forman estas células en el estadio de gástrula media. La formación de células en botella parece ser una manera para empacar una gran superficie en un espacio reducido y transportarla hacia el interior del embrión (Hardin y Keller, 1988). Durante el reesparcimiento, las células de botella de *Xenopus* pueden tener grandes efectos en la morfogénesis. Estas células pueden contribuir a la rotación y al inicio de la involución de la zona marginal. La constricción apical de las células en botella es anisotrópica. Las células de botella están orientadas en dirección animal-vegetal, y esto resulta en el movimiento de la zona marginal hacia el polo vegetal en vez que el movimiento sea animalmente, por lo tanto ayuda a

la iniciación de la involución. Este comportamiento anisotrópico no es intrínseco pero es el resultado de las propiedades mecánicas de los tejidos circundantes (Hardin y Keller, 1988).

En *X. laevis* por encima de la zona marginal se encuentra la zona marginal de no involución, que tiene propiedades distintivas, (NIMZ, por sus siglas en inglés), la cual se mantendrá al margen del cierre del blastoporo y no involucionará (Kumano y Smith, 2002). El sector dorsal de la NIMZ pasa por una activa convergencia y extensión independiente de los otros tejidos. El sector ventral de la NIMZ puede mostrar un comportamiento especial correspondiente a los movimientos de convergencia y engrosamiento de la zona marginal ventral (Keller y Danilchik, 1988).

El “engrosamiento convergente” de la zona marginal ventral se refiere al enlace de la convergencia con el engrosamiento del tejido (Keller y Danilchik, 1988). La convergencia en la zona marginal ventral ayuda a que la porción ventral del blastoporo se cierre pero al involucionarse esta zona no se extiende si no que se engrosa para formar un collar de mesodermo somítico y mesodermo ventral al final de la gastrulación (Keller *et al.*, 2003; Keller y Danilchik, 1988).

En la gastrulación, el mesodermo prospectivo involuciona por el labio del blastoporo hasta ubicarse bajo el ectodermo. Después de la involución, el techo del gastrocele queda cubierto por el mesodermo prospectivo, hasta el inicio de la neurulación (Pourquié, 2001; Shook *et al.*, 2004) a medida que la neurulación avanza, las crestas endodermales laterales recubren progresivamente el mesodermo prospectivo. De esta manera, el endodermo cubre el techo de la cavidad de la néurula o arquenterón (Shook *et al.*, 2004). En la néurula temprana de *X. laevis* y *E. machalilla* el endodermo cubre el techo del arquenterón en la región rostral del embrión (Saenz-Ponce *et al.*, 2012; Shook *et al.*, 2004), pero en la región caudal el

recubrimiento mesodermal determina la formación de la placa del techo del gastrocele (GRP, por sus siglas en inglés). El GRP es un epitelio del mesodermo prospectivo del notocordio y los somitas, que está flanqueando a los dos lados por las crestas endodermales laterales. En *X. laevis*, el GRP es internalizado al final de la neurulación y el techo del gastrocele es recubierto por el endodermo (Shook *et al.*, 2004).

En *X. laevis* una vez finalizado el proceso de gastrulación los labios del blastoporo se cierran y la región más dorsal del ectodermo se diferencia en la placa neural dando inicio al proceso de neurulación (Gilbert, 2003). La neurulación se evidencia con la formación de los pliegues neurales en los bordes de la placa neural. En *X. laevis* la placa neural es visible en el estadio 13. Los pliegues neurales se elevan en la néurula temprana, en el estadio 14 (Nieuwkoop y Faber, 1994). Durante la neurulación, la placa neural se alarga en el eje rostro-caudal, los pliegues neurales se elevan, se juntan en la línea media y se fusionan para formar el tubo neural, precursor del sistema nervioso. El tubo neural se diferenciará en las partes del cerebro y el cordón espinal en los estadios más avanzados del desarrollo. Las células de los pliegues neurales no se incorporan al ectodermo de piel ni al tubo neural y dan origen a la cresta neural. Al cerrarse el tubo neural estas células se separan como mesénquima y migran por diferentes rutas. Las células de la cresta neural dan origen al sistema nervioso periférico, a células de pigmento, huesos de cráneo y del rostro, y otras estructuras (Wolpert *et al.*, 2007).

La formación del tubo neural requiere cambios en la forma celular y migración celular (Greene y Copp, 2009). Durante la gastrulación, las células de la placa neural se alargan y se estrechan. Estas células mantienen la forma alargada hasta el inicio de la neurulación. La neurulación se inicia cuando los extremos de la placa neural se elevan. Las células de los extremos de la placa neural cambian de forma durante este proceso. Estas células se contraen

hasta adquirir una forma triangular como de cuña. Este cambio en la forma celular determina el establecimiento de los pliegues neurales (Colas y Schoenwolf, 2001). Los pliegues neurales se fusionan en la línea media para formar el tubo neural.

Cuando se ha formado el tubo neural, éste se separa del ectodermo que formará la epidermis. La separación del tubo neural involucra cambios en las fuerzas de adhesión L-CAM. Sin embargo, cuando los pliegues neurales se levantan, las células ectodermales del tubo neural expresan las moléculas de adhesión N-CAM y N-cadherinas. Mientras que el ectodermo que formará la epidermis solo expresa E-cadherinas. Este cambio en la expresión de moléculas de adhesión determina la separación del tubo neural y del ectodermo superficial (Colas y Schoenwolf, 2001; Wolpert *et al.*, 2007). Al final de la neurulación las estructuras internas que pueden ser reconocidas en *Xenopus* son: el tubo neural, el notocordio, la placa lateral de mesodermo, y se distinguen diferentes partes de los somitas.

Los somitas se generan a partir del mesodermo paraxial. En la somitogénesis, cada somita se forma en sentido rostral-caudal y de forma secuencial y sincrónica, de modo que los somitas más antiguos son los rostrales (Pourquié, 2001). Este proceso ocurre a los lados del tubo neural y del notocordio (Krneta-Stankic *et al.*, 2010). La maduración de los somitas produce tres regiones distintas: El esclerotoma es la región del somita más cercana al notocordio y dará origen a células mesenquimales que se diferenciarán en condrocitos de las vértebras y costillas. El dermatoma es una capa delgada de células, en la superficie lateral del somita, la más lejana al notocordio, que generará el tejido conectivo de la dermis. El miotoma ocupa la mayor parte y contiene a las células formadoras de músculo o mioblastos (Radice *et al.*, 1989).

La miogénesis es el proceso de diferenciación de los mioblastos, las células que componen el miotoma, hasta la generación de miotubos multinucleados, las células que forman

las fibras musculares (Radice *et al.*, 1989). Los procesos involucrados en el origen y morfogénesis de los somitas y la formación del miotoma son altamente variables (Keller, 1999). En *X. laevis*, el mesodermo paraxial se segmenta a través de un cambio coordinado en los mioblastos (Radice *et al.*, 1989). Los mioblastos alargados se encuentran, en un inicio, perpendiculares al tubo neural, en el mesodermo presomítico. Durante la somitogénesis, los mioblastos del mesodermo presomítico tienen una orientación perpendicular al tubo neural y durante la somitogénesis cambian su orientación. Los mioblastos giran y toman una orientación paralela con respecto al tubo neural, de tal forma que la longitud del mioblasto alcanza la longitud del somita (Kielbówna, 1981). En otras especies, el miotoma presenta mioblastos pequeños y redondeados que sufren eventos de intercalación o fusión hasta formar miotubos multinucleados. En *Bombina variegata*, *Engystomops coloradorum*, *Engystomops randi*, *Epipedobates anthonyi*; *Epipedobates machalilla*, *Epipedobates tricolor*; y *Gastrotheca riobambae* los mioblastos se alargan e intercalan entre sí, en *Pelobates fuscus* los mioblastos se fusionan (del Pino *et al.*, 2007; Gatherer y del Pino, 1992; Kielbówna, 1981; Radice *et al.*, 1989). En *X. laevis*, una vez concluida la morfogénesis y la diferenciación celular el desarrollo temprano continua con la organogénesis. La organogénesis es una fase crucial del desarrollo que conduce al embrión a volverse un organismo funcional, con capacidad de sobrevivir de manera independiente (Wolpert *et al.*, 2007). En los estadios de organogénesis, las capas germinales interactúan entre sí para dar origen a tejidos completos y órganos, mientras los embriones toman la forma de renacuajos. (Wolpert *et al.*, 2007).

El patrón general de desarrollo embrionario para anfibios se ha descrito sobre la base del organismo modelo *X. laevis*. Sin embargo, esta rana no representa el modelo del desarrollo de los anfibios en general (Keller, 1999). En la evolución de los anfibios, los embriones han

tenido que adaptarse a nuevos ambientes (Elinson y del Pino, 2012). Dentro de los anuros, incluso las especies comúnmente utilizadas, como modelos del desarrollo embrionario, de los géneros *Gastrotheca*, *Eleutherodactylus*, *Bufo*, *Rana* y *Xenopus*, divergen una de la otra en cientos de millones de años (Elinson y del Pino, 2012). Tanto la historia filogenética como la variabilidad en las estrategias reproductivas influyen en la divergencia de los anfibios del patrón general del desarrollo descrito para *X. laevis*. (Duellman y Trueb, 1986; del Pino y Looor-Vela, 1990; Duellman, 1992).

Los anuros incluyen a unas 6000 especies, con una gran diversidad de estrategias reproductivas (Elinson y del Pino, 2012), diferencias en el tamaño del huevo, velocidad de desarrollo. Duellman y Trueb (1986) proponen tres categorías de modos reproductivos del desarrollo del huevo en base al hábitat: huevos acuáticos, huevos en nidos terrestres y huevos en nidos de espuma. Dentro de estas categorías se detallan 29 modos de reproducción (Wells, 2007).

El modo más común es el acuático, está presente en alrededor del 80% de las familias de anuros (Duellman y Trueb, 1986). Es el modo más basal, las especies que presentan este modo de reproducción depositan sus huevos en el agua donde se desarrollan hasta su metamorfosis (Gomez-Mestre *et al.*, 2012). Algunas especies de anuros se desarrollan en hábitats distintos al acuático, sin embargo sus renacuajos tienden a alimentarse en el agua. El desarrollo en hábitat terrestre es otro modo de reproducción, algunas especies cuidan celosamente sus huevos, incluso son incubados en el cuerpo de los adultos. Existen modos intermedios donde los huevos son depositados en nidos de espuma, gelatina, bromelias, hojas, sacos vocales, entre otros. (Duellman y Trueb, 1986; Haddad y Prado, 2005; Wells, 2007). El

modo de reproducción más extremo es el desarrollo directo, en el que no existe el estadio larval de vida libre (Gomez-Mestre *et al.*, 2012).

En el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE se realizan estudios comparativos en especies con diferencias en el modo de reproducción, velocidad del desarrollo y tamaño del huevo. Los resultados de los estudios realizados muestran las divergencias en el desarrollo temprano con respecto a la rana modelo del desarrollo *X. laevis*. Los estudios comparativos muestran que los modos de gastrulación divergen de acuerdo a la velocidad del desarrollo (del Pino *et al.*, 2007).

El estudio de la expresión de *Brachyury* y *Lhx1* permitió determinar que existe diferencia en el tiempo de ocurrencia de los procesos morfogenéticos en la gastrulación entre ranas ecuatorianas de diferente velocidad de desarrollo (revisado en Elinson y del Pino, 2012). La expresión de *Brachyury* en las ranas de desarrollo rápido, *X. laevis* y *E. randi*, permitió determinar que el alargamiento del arquenterón, la extensión del notocordio y la convergencia y extensión dorsal coinciden con la involución de células en el labio dorsal del blastoporo durante la gástrula media. En contraste, en la rana de desarrollo lento *E. machalilla* la involución y el limitado alargamiento del arquenterón ocurren simultáneamente durante la gastrulación. Mientras que el alargamiento del notocordio y, por lo tanto, la convergencia y extensión dorsales, están retrasados hasta después de la gastrulación, es decir después del cerramiento del blastoporo. En *G. riobambae* solamente la involución ocurre durante la gastrulación. Los procesos de alargamiento del arquenterón, extensión del notocordio y la convergencia y extensión dorsal son eventos post-gastrulación (revisado en Elinson y del Pino,

2012; Venegas-Ferrín *et al.*, 2010). El estudio de la expresión de *Lhx1* también muestra la variación del organizador en ranas ecuatorianas de diferente velocidad de desarrollo.

La diferencia temporal del organizador es otro ejemplo de divergencia en el modo de gastrulación en ranas que difieren en la velocidad de desarrollo. El organizador se desarrolla del labio dorsal del blastoporo y está dividido en organizador de la cabeza, del tronco y de la cola. El organizador de la cabeza y tronco están representados por la placa precordial y el notocordio, respectivamente. La expresión de *Lhx1* reveló la presencia simultánea de ambos organizadores durante la gastrulación en las ranas de desarrollo rápido *X. laevis* y *E. randi*. En cambio, en la rana de desarrollo lento *E. machalilla* se observó que el organizador del tronco está separado temporalmente del organizador de la cabeza, ya que el organizador del tronco en esta rana fue detectado después del cierre del blastoporo (Venegas-Ferrín *et al.*, 2010). En embriones de la rana de desarrollo lento *G. riobambae* la placa precordial no pudo ser claramente detectada. Mientras que la expresión de *Lhx1* en el notocordio fue detectada después del cierre del blastoporo al igual que en *E. machalilla* (Venegas-Ferrín *et al.*, 2010).

Uno de los modos más divergentes en la gastrulación de anfibios es la presencia de un disco embriónico en la rana marsupial *G. riobambae*. En la rana de desarrollo lento *G. riobambae* las células que involucionan por el labio del blastoporo durante la gastrulación provocan que este se engrose debido a que las células permanecen en este sitio durante la gastrulación. Esta acumulación de células forma un gran collar circumblastoporal que al momento del cerramiento del blastoporo constituirá el disco embriónico (revisado en Elinson y del Pino, 2012). El disco embriónico se desarrolla alrededor del cerramiento del blastoporo, y a partir de este se derivará el cuerpo del embrión. La presencia de este disco embriónico se

asemeja a lo que ocurre en el desarrollo del pollo aunque no son estructuras homólogas ya que los embriones de *G. riobambae* tienen clivaje holoblástico, presentan involución de células en el labio dorsal del blastoporo y forman un blastoporo. En la rana de desarrollo lento *E. machalilla* sí ocurre engrosamiento del labio del blastoporo y del collar circumblastoporal por la acumulación de células involucradas, pero no hay formación de un disco embrionario (revisado en Elinson y del Pino, 2012).

Estudios recientes realizados en el Laboratorio de Biología del Desarrollo han mostrado que la expresión de *mix1* para *E. randi* y *E. machalilla* en comparación *X. laevis* son equivalentes entre sí. Por lo tanto, se considera que la expresión de la proteína *mix1* es altamente conservada en ranas (López, 2012). En el análisis de la expresión de la proteína *vegt* se observó que en la región vegetal de la blástula de *X. laevis* y *E. machalilla* existe un área libre de la expresión de *vegt* que posiblemente corresponda a endodermo nutritivo. En *E. randi* no se observó área libre de *vegt* en la región vegetal (Garcés, 2012). Además, se realizaron análisis sobre el patrón de somitogénesis en *H. vertebralis* y *D. auratus*. El estudio mostró que el patrón de somitogénesis de estas especies coincide con el patrón de interdigitación celular descrito para *B. variegata* y *E. machalilla* (Hervas, 2012).

En el presente estudio se utilizaron dos especies de ranas *Hyalinobatrachium fleischmanni* y *Espadarana callistomma* (Anura: Centrolenidae). Estas especies fueron seleccionadas para su análisis debido a la disponibilidad de embriones donados por el Balsa de los Sapos de la PUCE. Las dos especies pertenecen a la familia Centrolenidae. Las ranas de la familia Centrolenidae son comúnmente conocidas como “ranas de cristal”, debido a la su característico vientre transparente que permite ver los órganos internos. Las ranas de cristal son

endémicas de América tropical, siendo particularmente diversas en los bosques nublados andinos de Colombia y Ecuador (Delia *et al.*, 2010 y Wells, 2007). Estas ranas son arbóreas y viven a lo largo de riachuelos donde depositan sus huevos en las hojas de arbustos y árboles que cuelgan sobre el agua de los riachuelos o sobre piedras en los bordes de cascadas. Los machos usualmente emiten sus cantos desde hojas cercanas a los huevos y en algunas especies existe cuidado parental. Luego de eclosionar, los renacuajos caen al agua donde terminan su desarrollo (Delia *et al.*, 2010 ; Jacobson, 1985).

La rana *H. fleischmanni* se encuentra desde el sur de México hasta el norte de Suramérica, incluyendo al Ecuador (Savage, 2002). Es una especie nocturna, los machos son territoriales. Las hembras depositan entre 18 a 30 huevos en el envez de las hojas que cuelgan sobre corrientes de agua (Savage, 2002). En esta especie el cuidado parental predominantemente cumple la función de hidratar a los embiones expuestos a condiciones de humedad limitada del habitat arboreo. (Delia *et al.*, 2010). Este comportamiento parece ser estimulado por los patrones de clima temporales, el cuidado se incrementa en las temporadas secas (Delia *et al.*, 2010).

La especie *E. callistomma* se encuentra en cuatro localidades en el bosque siempreverde de tierras bajas al noroeste de Ecuador (Guayasamin y Trueb 2007). Esta especie está activa durante la noche y ha sido encontrada en hojas a lo largo de riachuelos. La superficie superior de las hojas sirve de sitio de canto de los machos y oviposición de las hembras (Guayasamin y Trueb 2007).

Este estudio tiene como objetivo describir la morfología de los embriones desde el clivaje hasta la eclosión del renacuajo de *H. fleischmanni* y *E. callistomma*. Este trabajo

contribuye con los análisis comparativos que se realizan en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE y aportará como herramienta para posteriores estudios con estas especies.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE LOS EMBRIONES

Las posturas de *Hyalinobatrachium fleischmanni* y *Espadarana callistomma* fueron donadas por la Balsa de los Sapos de la PUCE. Los especímenes de las dos especies provienen de la localidad Durango, río Durango y afluentes en la Provincia de Esmeraldas. En el Laboratorio de Biología del Desarrollo, las posturas, son trasladadas a cámaras húmedas, las cuales son cajas de Petri de cristal pequeñas con una cama de papel absorbente empapado en agua destilada. Sobre esta cama se coloca un pedazo de plástico y sobre el mismo se incuban los embriones. Cada caja es rotulada con datos que ayuden a identificar a los embriones como fecha y hora, el número de postura encontrada, la especie a la que pertenece, el estadio y la cantidad de huevos dentro de la postura.

### 4.2 PROCESAMIENTO Y FIJACIÓN DE LOS EMBRIONES

#### 4.2.1 SOLUCIONES Y FIJATIVOS

##### 4.2.1.1. SOLUCIÓN DE STEINBERG (Rugh, 1965)

- 58 mm NaCl
- 0.65 mm KCl

- 0.85 mm MgSO<sub>4</sub>
- 5 mm Tris, pH 8
- 0,34 mm Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
- Agua destilada

#### 4.2.1.2. SOLUCIÓN SALINA TAMPÓN FOSFATO (PBS)

- 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 137.7 mM NaCl

#### 4.2.1.3. FORMALINA 10 %

- 100 ml formaldehído (37 % stock)
- 900 ml agua destilada.

#### 4.2.1.4. FIJATIVO SMITH

##### 4.2.1.4.1. SOLUCIÓN A

- 10 gramos dicromato de potasio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) en 1 litro de agua destilada.

#### 4.2.1.4.2. SOLUCIÓN B

- 200 ml formalina (37 % formaldehído)
- 50 ml ácido acético
- 750 ml agua destilada

El fijativo Smith se prepara inmediatamente antes de usar, en una proporción 1:1 de las soluciones A (4.2.1.4.1) y B (4.2.1.4.2).

#### 4.2.1.5. GELATINA 7,5%

- 1,5 g gelatina “Royal” sin sabor.
- 20 ml PBS 1x (4.2.1.2).

#### 4.2.1.6. AGAROSA 6%

- 1,2 g agarosa 100%
- 20 ml PBS 1x (4.2.1.2)

### 4.2.2 PROCESAMIENTO DE LOS EMBRIONES

Los embriones de las dos especies de ranas fueron manipulados y observados en la solución de Steinberg al 15% (4.2.1.1). Para las observaciones, se utilizó el estereomicroscopio WILD Heerbrugg y lámparas de fibra óptica KL 1500 (Zeiss). Para determinar el diámetro de

los embriones, se utilizó el programa Axiovision 4.6.3 a partir de microfotografías tomadas con el microscopio Stemi SV6 de Carl Zeiss.

Los estadios de *H. fleischmanni* y *E. callistomma* fueron adoptados a partir de la comparación de su desarrollo externo con la tabla general del desarrollo de anfibios de Gosner (1960) y la tabla del desarrollo de *Xenopus laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994).

Embriones en todos los estadios del desarrollo fueron fijados para su futura observación, documentación y manipulación. Todas las observaciones se realizaron a temperatura ambiente dentro del laboratorio.

#### 4.2.3 FIJACIÓN DE EMBRIONES

Para fijar los embriones de *H. fleischmanni* y *E. callistomma* se les retiró las capas de gelatina con la ayuda de pinzas de relojero bajo el microscopio. Los embriones fueron manipulados en la solución salina de Steinberg 0,15x (4.2.1.1). Esta solución mantiene el pH estable e impide la deshidratación de los embriones. Este es un proceso delicado que se llevó a cabo bajo un estereoscopio WILD (Heerbrugg) e iluminación con lámparas de fibra óptica HL 1500 (Zeiss).

##### 4.2.3.1 FIJACIÓN CON SMITH

Los embriones sin gelatina, fueron fijados durante 24 horas en el fijativo de Smith (4.2.1.4). Los embriones con el fijativo se dejaron en frascos oscuros a temperatura ambiente.

Al día siguiente, se realizaron varios lavados con agua destilada hasta eliminar el exceso de fijativo. Finalmente, los embriones se guardaron en tubos eppendorf de 1,5 ml con 600 µl de formalina 10 % (4.2.1.3) y 900 µl de PBS 1X (4.2.1.2), a 4 °C. El fijativo de Smith se utiliza para preservar la morfología interna de los embriones y evitar que sus cavidades colapsen.

### **4.3 OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LOS EMBRIONES.**

#### **4.3.1 BISECCIONES**

Los embriones en los estadios deseados, previamente fijados en el fijativo de Smith (4.1.1.4), fueron embebidos en glicerol y seccionados en su parte media usando un bisturí. Cada una de las mitades fue conservada en una mezcla 2:3 de Formalina 10% (4.2.1.3) y PBS 1X (4.2.1.2), a 4 °C hasta ser requeridas.

#### **4.3.2 SECCIONES EN VIBRATOME**

Los embriones enteros y las bisecciones de las dos especies de ranas centrolénidas, fueron embebidas en gelatina 7.5% (4.2.1.5) e incubados por 4 horas a 45 °C con el fin de evitar que las células se desprendan durante el seccionamiento.

Luego los embriones fueron trasladados a una caja con agarosa líquida al 6% (4.2.1.6). Cuando la agarosa se solidificó, se cortó un cubo de agarosa que contenía al embrión. El cubo de agarosa fue adherido, con pegamento instantáneo, a un porta-tejidos. El porta-tejidos fue asegurado en la plataforma del Vibratomo Oxford. El contenedor del Vibratomo se llenó con 600ml de agua destilada para recoger las secciones. Se realizaron secciones sagitales, transversales y horizontales de 50  $\mu\text{m}$  de espesor, utilizando una cuchilla metálica de la marca Gillette. Las secciones fueron realizadas a una velocidad 2,5 y amplitud 6 con un ángulo de 25°. Las secciones obtenidas se colocaron en una caja con PBS 1x (4.2.1.2) y formalina 10% (4.2.1.3.) y fueron guardadas a 4 °C hasta su posterior estudio y registro fotográfico.

#### 4.3.3. TINCIÓN FLUORESCENTE PARA NÚCLEOS CON HOECHST 33258

Las secciones de Vibratomo fueron teñidas con el tinte fluorescente Hoechst 33258, el cual se adhiere al ADN de los núcleos celulares haciendo posible su observación gracias a iluminación fluorescente. Las secciones fueron lavadas con PBS (4.2.1.2) y colocadas en pocillos de plástico. Fueron incubadas por 20 minutos en una solución de 1  $\mu\text{l}$  de Hoeschst 33258 en 1 ml de PBS (4.2.1.2). La incubación se realizó a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, las secciones fueron lavadas 5 veces con PBS 1x (4.2.1.2), y almacenadas en glicerol. Finalmente se preparó el montaje, de las secciones teñidas, en placas. Las secciones fueron transferidas a un portaobjetos de cristal con una gota de glicerol, y fueron cubiertas con un cubreobjetos. Las placas fueron almacenadas a -20 °C, hasta ser observadas y fotografiadas.

#### **4.4 FOTOGRAFÍA DE EMBRIONES ENTEROS, BISECCIONES, SECCIONES Y PLACAS**

Los embriones enteros, bisecciones y las secciones sin tinción de núcleos fueron fotografiados utilizando en estereomicroscopio Stemi SV6, de Carl Zeiss. Las imágenes fueron tomadas utilizando luz directa. Las placas con la tinción fluorescente de núcleos fueron fotografiadas utilizando un microscopio AxioObserver.Z1, de Carl Zeiss. Para todas las fotografías se utilizó una cámara AxioCam y el programa de procesamiento de imágenes Axiovision 4.6.3. Las imágenes obtenidas fueron editadas utilizando el programa Adobe Photoshop CS6.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 EL DESARROLLO TEMPRANO DE *H. fleischmanni* Y *E. callistomma*.

El desarrollo temprano de *H. fleischmanni* (Fig. 1A-G) es similar al de *E. callistomma* (Fig 1 H-N). Las dos especies depositan sus huevos en masas gelatinosas en hojas que cuelgan sobre corrientes de agua, ambas especies presentan embriones con un diámetro promedio de 2.1 mm. Después de la fertilización de los huevos, los embriones atravesaron las etapas de clivaje (Figs 2 y 18), blástula (Figs. 3-4 y 19), gastrulación (Figs. 5-11 y 20-25), neurulación (Figs. 12-14 y 26- 28) y morfogénesis, hasta la eclosión del renacuajo (Figs. 15-17 y 29-33).

Las diferencias encontradas, entre el desarrollo de ambas especies, serán anotadas a lo largo de la presente descripción. Los huevos de *H. fleischmanni* son de color blanco-ligeramente verdoso. Los huevos de *E. callistomma* son de color marrón, la pigmentación decrece a lo largo del eje animal- vegetal. El desarrollo embrionario de las dos especies se dividió en 25 estadios, desde la fertilización hasta la eclosión del renacuajo. Los estadios de clivaje, blástula, gástrula, hasta el estadio de néurula temprana (estadio 14) fueron determinados usando la tabla de desarrollo de *X. laevis*. Los estadios más avanzados, hasta la eclosión del renacuajo, fueron determinados mediante la tabla general del desarrollo de los anfibios (Gosner, 1960) debido a diferencias en la morfología de los embriones.

Los tiempos de desarrollo de *H. fleischmanni* se muestran en la tabla 1 y de *E. callistomma* en la tabla 2. Los tiempos, en horas, corresponden al tiempo que tardó un embrión en desarrollarse hasta el estadio determinado.

Los embriones de *H. fleischmanni* tardan 5 días aproximadamente desde el estadio 8 hasta el estadio 23 (pre-eclosión) (Tabla 1), los embriones de *E. callistomma* tardan 12 días aproximadamente desde el estadio 6 hasta eclosionar (Tabla 2), no se obtuvieron embriones en los estadios más tempranos debido a la escasez de posturas en las dos especies.

## **5.2 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LOS EMBRIONES DE *H. fleischmanni* Y *E. callistomma*.**

La morfología y la estructura de los embriones se estudiaron mediante bisecciones sagitales y secciones sagitales y transversales. Se realizó la tinción fluorescente de núcleos para la observación de la disposición celular.

### **5.2.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LOS EMBRIONES DE *H. fleischmanni*.**

#### **5.2.1.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL EMBRIÓN EN ESTADIO DE 32 CÉLULAS (ESTADIO 6) DE *H. fleischmanni*.**

La figura 2A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de 32 células. En el embrión en el estadio de 32 células de *H. fleischmanni* (Fig. 2B) se observó que los macrómeros poseen un mayor tamaño en comparación con los micrómeros. Los micrómeros, visibles en el hemisferio animal (Fig. 2C), varían de tamaño. En la bisección (Fig. 2D) se observó un blastocelo pequeño, no se observó pigmento alrededor de los núcleos

celulares, en contraste a lo observado en las especies del género *Engystomops* (del Pino *et al.*, 2012).

#### 5.2.1.2 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA BLÁSTULA DE CÉLULAS GRANDES (ESTADIO 7) DE *H. fleischmanni*.

La figura 3A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de blástula de células grandes. El estadio 7 abarca varias divisiones celulares desde el sexto evento de clivaje. Las sucesivas divisiones celulares reducen el tamaño de las células que componen el embrión. En este estadio, aún se puede apreciar la diferencia de tamaño entre las células del hemisferio animal y las células del hemisferio vegetal (Fig. 3B). La imagen en la figura 3C muestra las células del hemisferio animal cuyo número es mayor y su tamaño es inferior que en el estadio 6. En la bisección sagital (Fig. 3D) se observó un blastocele de extensión mediana, desplazado hacia la porción animal del embrión. Las células del techo del blastocele no mostraron pigmento alrededor de los núcleos.

#### 5.2.1.3 MORFOLOGÍA DE LA BLÁSTULA DE CÉLULAS MEDIANAS (ESTADIO 8) DE *H. fleischmanni*.

En este estadio, las células presentan un menor tamaño a las células de los embriones en estadio 7 (Fig. 4A). El estadio de blástula de células medianas es equivalente al estadio 8 de la

tabla de Gosner (1960). La morfología interna no se muestra debido a la destrucción del embrión durante el biseccionamiento y a la falta de más embriones en este estadio.

#### 5.2.1.4 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA. ESTADIO: LABIO DORSAL DEL BLASTOPORO (ESTADIO 10) DE *H. fleischmanni*.

La figura 5A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de gástrula temprana. En la gástrula temprana (Fig. 5B) se observó el labio dorsal del blastoporo como una hendidura curva en la región sub-ecuatorial del embrión. En la sección sagital (Fig. 5C) se observó al blastocele expandido sobre todo el hemisferio animal. En la región dorsal-vegetal, producto de la invaginación de las células del labio dorsal, se observó una cavidad interna que dará origen la arquenterón. La cavidad en la región vegetal del embrión es un artefacto de la fijación. La figura 5D corresponde a un acercamiento del labio dorsal del blastoporo de una tinción fluorescente de núcleos de la sección sagital. Se observa con mayor claridad la cavidad que dará origen al arquenterón. En la tinción fluorescente de núcleos de una sección sagital (Fig. 5E) se observó que el techo del blastocele está formado por 3 o 4 capas de células.

#### 5.2.1.5 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA (ESTADIO 11) DE *H. fleischmanni*.

La figura 6A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de gástrula temprana (estadio 11). En la gástrula temprana, más avanzada en el desarrollo (Fig. 6B), producto del avance del labio dorsal del blastoporo hacia la región ventral, se formó el tapón de yema. En la sección sagital (Fig. 6C) se observaron los labios dorsal y ventral del blastoporo y el cleft de Brachet en la zona dorsal y ventral. El tamaño del blastocele se redujo, producto de la invasión del techo del blastocele por las células vegetales. El arquenterón presentó una mayor expansión. La expansión del arquenterón corresponde tanto al incremento en su longitud, como su inflación. La figura 6D corresponde a la tinción fluorescente de núcleos de una sección sagital. En esta sección, se pudo observar que el techo del blastocele está formado por dos capas de células.

#### 5.2.1.6 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA MEDIA. EMBRIÓN CON TAPÓN DE YEMA MEDIANO (ESTADIO 12) DE *H. fleischmanni*.

La figura 7A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de gástrula media. El tapón de yema, en este estadio (Fig. 7B), mostró un diámetro menor. En la sección sagital (Fig. 7C) se observó un blastocele de menor tamaño, en relación al estadio 11. Un tabique de células, separa al blastocele del arquenterón. El arquenterón presenta una mayor

expansión. También se pudo observar un aumento en el tamaño del arquenterón en la región ventral. La figura 7D corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de la sección sagital. En esta sección se observó el techo del arquenterón y la extensión del arquenterón. Se consideró como ectodermo a la capa superficial del techo del arquenterón y como endo-mesodermo a la capa interna, la cual está recubriendo al arquenterón. Se observó el cleft de Brachet. La figura 7E corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de la sección sagital. Se observa el tamaño reducido del blastocele, las células de la zona vegetal recubren gran parte del techo del blastocele y reducen la superficie expuesta de la bicapa de células del techo. El engrosamiento de una zona del techo del blastocele es producto del seccionamiento desigual.

#### 5.2.1.7 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TARDÍA. EMBRIÓN CON TAPÓN DE YEMA PEQUEÑO (ESTADIO 12.5) DE *H. fleischmanni*.

La figura 8A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de gástrula tardía. En este estadio (Fig. 8B), el tapón de yema se ha reducido notablemente y se observó el surco neural; este surco nace del reducido tapón de yema y recorre la línea media dorsal. Todos los embriones observados en este estadio presentaron la misma morfología externa. La sección sagital (Fig.8C) muestra el arquenterón completamente expandido. También se pudo observar un aumento en el tamaño del arquenterón en la región ventral. La figura 8D corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de una sección sagital que muestra el techo del arquenterón. Se muestran los primeros indicios de la diferenciación del ectodermo neural, presente en la zona dorsal anterior.

La figura 9A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de gástrula tardía. La sección transversal anterior (Fig. 9B) muestra la ubicación de las capas germinales respecto al arquenterón. El notocordio se observa como un paquete central de células que se diferencia del mesodermo paraxial, a ambos lados. Se observó el recubrimiento endodermal del arquenterón. La figura 9C corresponde a una tinción fluorescente para núcleos de la misma sección sagital. Se observó el ectodermo de piel, el mesodermo paraxial, el notocordio y el endodermo.

#### 5.2.1.8 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA POST-GÁSTRULA (ESTADIO 13) DE *H. fleischmanni*.

La figura 10A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de post-gástrula. En este estadio (Fig. 10B) con mayor frecuencia, los embriones presentan un pequeño tapón de yema. A pesar de esto la placa neural y el surco neural están presentes, lo cual permite la identificación del estadio 13. La sección sagital (Fig. 10 C) muestra el tapón de yema, y los remanentes de blastocele. La figura 10D corresponde a la tinción fluorescente para núcleos de la misma sección sagital. Se observa una porción del techo del arquenterón. Se diferencian las capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo, el cual está recubriendo al arquenterón.

La figura 11A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de post- gástrula. En la figura 11B se observaron la placa neural y el surco neural. La figura 11C muestra la parte interna del techo del arquenterón. Se observó la región conocida como techo

del arquenterón (GRP, “Gastrocoel roof plate” en inglés). Esta es una estructura en forma de lágrima. La figura 11D corresponde a una tinción fluorescente de una sección transversal a través de la región rostral de embrión, se observó el ectodermo, el notocordio, el mesodermo paraxial y el endodermo, en contacto con el arquenterón. La figura 11E corresponde a una tinción fluorescente de una sección transversal a través de la región caudal del embrión, se observó el ectodermo, el mesodermo paraxial, el notocordio. Existe notocordio descubierto de endodermo en esta sección en una parte más posterior correspondiente al GRP.

#### 5.2.1.9 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA TEMPRANA (ESTADIO 14) DE *H. fleischmanni*.

La figura 12A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de néurula temprana. En la néurula temprana (Fig. 12B) se observó la placa neural y los pliegues neurales elevados. En la región rostral los pliegues fueron más prominentes. En la parte caudal del embrión (Fig. 12C) se observó el blastoporo. En la tinción fluorescente de núcleos de una sección transversal (Fig. 12D) se observó la gruesa placa neural, el notocordio y el mesodermo paraxial. Se observó que el techo del arquenterón está cubierto por endodermo. Se pudo diferenciar el ectodermo de piel del ectodermo de la placa neural. El límite entre el mesodermo paraxial y el notocordio se observó claramente. Las células del mesodermo paraxial tienen forma redondeada y se encuentran desorganizadas.

#### 5.2.1.10 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA MEDIA (ESTADIO 15) DE *H. fleischmanni*.

La figura 13A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de néurula media. La figura 13B muestra la néurula media. Se observó que los pliegues neurales se han acercado en la línea media del cuerpo. Como resultado de este acercamiento se ha profundizado el surco neural en la parte media de la placa neural. En la parte caudal del embrión se observó el blastoporo (Fig. 13C). En la figura 13D se observó que las células de los pliegues neurales han cambiado su organización y se encuentran las compactas. Estas células tienen forma alargada. Se pudo distinguir claramente la estructura circular del notocordio. A los lados del notocordio se observan células mesodermales que aún no están condensadas en somitas.

#### 5.2.1.11 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA TARDÍA (ESTADIO 16) DE *H. fleischmanni*.

En la figura 14A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de néurula tardía. En la néurula tardía (Fig. 14B) se observó que los pliegues neurales se han juntado. La figura 14C muestra una sección transversal de la néurula tardía. Los pliegues neurales aún no se han fusionado. El notocordio es distinguible y tiene forma redonda. En la tinción fluorescente de una sección transversal (Fig. 14D) se observó el notocordio, los pliegues neurales, los somitas y el recubrimiento endodermal del arquenterón.

#### 5.2.1.12 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE YEMA DE LA COLA (ESTADIO 17) DE *H. fleischmanni*.

La figura 15A es un esquema de los embriones de la morfología externa de los embriones del estadio de yema de la cola. En el embrión entero del estadio de yema de la cola (Fig. 15B) se observó la presencia de la yema de la cola y la forma arqueada de los embriones, que se desarrollan sobre la masa de yema. En este estadio, se pudo ya diferenciar los cuatro arcos branquiales y los pronefros en la zona lateral de la cabeza. En la sección sagital (Fig. 15C) se observaron los somitas y el mesodermo paraxial en la parte posterior del embrión.

#### 5.2.1.13 MORFOLOGÍA DEL ESTADIO DE DESARROLLO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 21) Y DEL ESTADIO DE DESARROLLO COMPLETO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 23) DE *H. fleischmanni*.

La figura 16A corresponde a un esquema que muestra la ramificación de las branquias en el estadio de desarrollo de las branquias (estadio 21). En este estadio se observó que el primer par de branquias tiene 2 ramificaciones. El segundo par de branquias no se ha ramificado todavía. La figura 16B corresponde a un esquema que muestra la ramificación de las branquias en el estadio de desarrollo completo de las branquias (estadio 23). En este estadio se observó que el primer par de branquias tiene 5 ramificaciones. El segundo par de branquias tiene 4 ramificaciones. En embrión entero del estadio de desarrollo de la branquias (Fig. 16C) se observó que la rama posterior de las branquias tiene un desarrollo retardado en comparación

con la rama anterior. En el embrión entero del estadio de desarrollo completo de las branquias (Fig. 16D) se observaron las branquias completamente desarrolladas. Se observó el estomodeo y la transparencia de las aletas de la cola.

#### 5.2.1.14 MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN A LA ECLOSIÓN (ESTADIO 25) DE *H. fleischmanni*.

Los embriones de *H. fleischmanni* iniciaron su etapa de vida libre desde este estadio. En el embrión entero a la eclosión (Fig. 17A) se observó branquias sólo a un lado del embrión. Se observó externamente los somitas y la transparencia de las aletas de la cola. En el acercamiento de la cabeza del embrión (Fig. 17B) se observó el ojo, el estomodeo y el pigmento en la parte dorsal. En el acercamiento ventral de la cabeza (Fig. 17C) se observó que el opérculo a cubierto por completo las branquias externas del lado izquierdo del embrión y que en el lado derecho las branquias externas aún son visibles pero no en toda su extensión.

#### 5.2.2 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LOS EMBRIONES DE *E. callistomma*.

##### 5.2.2.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL EMBRIÓN EN ESTADIO DE 32 CÉLULAS (ESTADIO 6) DE *E. callistomma*.

La figura 18A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de 32 células. En el embrión en el estadio de 32 células de *E. callistomma* (Fig. 18B) se observó

que los micrómeros poseen mayor pigmentación que los macrómeros y que son significativamente de menor tamaño que los macrómeros. Los micrómeros, visibles en el hemisferio animal (Fig. 18C), varían de tamaño. En la bisección (Fig. 18D) se observó un blastocele pequeño, no se observó pigmento alrededor de los núcleos celulares.

#### 5.2.2.2 MORFOLOGÍA DE LA BLÁSTULA DE CÉLULAS MEDIANAS (ESTADIO 8) DE *E. callistomma*.

La figura 19A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de blástula de células medianas. En el embrión en el estadio de blástula de células medianas (Fig. 19B) se observó que las células presentan un menor tamaño a las células de los embriones en estadio 6. El estadio de células medianas es equivalente al estadio 8 de la tabla de Gosner (1960). Se observó que el hemisferio animal posee una pigmentación más intensa que el hemisferio vegetal. En el hemisferio animal (Fig. 19C) se observa el tamaño reducido de las células y su marcada pigmentación. En la sección sagital (Fig. 19D) se observó la extensión del blastocele. La figura 19E corresponde una tinción fluorescente de la sección sagital que muestra el techo del blastocele. Se observó que el techo del blastocele está formado por 4 o 5 capas de células.

### 5.2.2.3 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA. ESTADIO: LABIO DORSAL DEL BLASTOPORO (ESTADIO 10) DE *E. callistomma*.

La figura 20A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de gástrula temprana. En la gástrula temprana (Fig. 20B) se observó el labio dorsal del blastoporo como una hendidura curva en la región sub-ecuatorial del embrión. La hendidura posee una pigmentación más oscura que las células a su alrededor. En la sección sagital (Fig. 20C) se observó al blastocele expandido sobre el hemisferio animal. En la región dorsal-vegetal se observó una pequeña hendidura, el labio dorsal del blastoporo. No se observó el arquenterón debido a que el embrión estaba en un estadio muy temprano de gastrulación y el arquenterón aún no se había formado. La figura 20D corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de la sección sagital que muestra un acercamiento del techo del blastocele. Se observó que el techo está formado por una capa de 6 o 7 células. Las células del techo del blastocele de este estadio son de menor tamaño que las células del techo del estadio 8. La figura 20E corresponde a una tinción fluorescente de la sección sagital que muestra un acercamiento del labio dorsal del blastoporo. Se observaron las células de botella.

### 5.2.2.4 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA (ESTADIO 11) DE *E. callistomma*.

La figura 21A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de gástrula temprana (estadio 11). En la gástrula temprana (Fig. 21B) producto del avance del labio dorsal del blastoporo hacia la región ventral, se formó el tapón de yema. En la sección sagital

(Fig. 21C) se observaron los labios dorsal y ventral del blastoporo y el cleft de Brachet en la zona dorsal. El tamaño del blastocele se ha reducido, producto de la invasión del techo del blastocele por las células vegetales. El arquenterón presentó alargamiento sin expansión. La cavidad en la región vegetal es un artefacto de la fijación. La figura 21D corresponde a la tinción fluorescente de núcleos de una sección sagital que muestra el techo del blastocele. Se pudo observar que el techo del blastocele está formado por dos capas de células.

#### 5.2.2.5 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA MEDIA. EMBRIÓN CON TAPÓN DE YEMA MEDIANO (ESTADIO 12) DE *E. callistomma*.

La figura 22A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de gástrula media. El tapón de yema, en este estadio (Fig. 22B), mostró un diámetro menor. En la bisección sagital (Fig. 22C) se observó la reducción del tamaño del blastocele y la expansión del arquenterón. Se observó un tabique de células, que separa el blastocele del arquenterón. También se observó el aumento de tamaño del arquenterón en la región ventral. En la sección sagital (Fig. 22D) se observó al blastocele, al arquenterón y el cleft de Brachet. La figura 22E corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de la sección sagital que muestra el techo del arquenterón. Se consideró como ectodermo a la capa superficial del techo del arquenterón y como endo-mesodermo a la capa interna, en contacto con el arquenterón. Se observó el cleft de Brachet.

#### 5.2.2.6 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TARDÍA. EMBRIÓN CON TAPÓN DE YEMA PEQUEÑO (ESTADIO 12.5) DE *E. callistomma*.

La figura 23A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de gástrula tardía. En este estadio (Fig. 23B), el tapón de yema se ha reducido notablemente. La sección sagital (Fig.23C) muestra el arquenterón completamente expandido. También se pudo observar un aumento en el tamaño del arquenterón en la región ventral. La figura 23D corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de una sección sagital que muestra el techo del arquenterón. Se observó el cleft de Brachet y el endo-mesodermo. En este estadio no se pudo ver con claridad el ectodermo.

#### 5.2.2.7 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA POST-GÁSTRULA (ESTADIO 13) DE *E. callistomma*.

La figura 24A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de post-gástrula. En este estadio (Fig. 24B) con mayor frecuencia, los embriones presentan un pequeño tapón de yema. La sección parasagital (Fig. 24C) muestra el collar circumblastoporal. Se observó el arquenterón expandido y el cleft de Brachet. Además se observó la una mayor extensión del arquenterón en la región ventral. La figura 24D corresponde a la fluorescencia nuclear de la sección parasagital. Se observa una porción del techo del arquenterón y el collar circumblastoporal. Se observó el cleft de Brachet. La figura 24E corresponde a una tinción

fluorescente de la sección parasagital que muestra el techo del arquenterón. Se diferencian las capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo el cual está recubriendo al arquenterón.

La figura 25A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de post-gástrula. La figura 25B muestra un embrión entero en el estadio de post-gástrula. Se observaron la placa neural y el surco neural. La figura 25C muestra la parte interna del techo del arquenterón. Se observó la región conocida como techo del arquenterón (GRP, “Gastrocoel roof plate” en inglés). Esta es una estructura en forma de lágrima, con un color diferencial. La figura 25D corresponde a una tinción fluorescente de una sección transversal a través de la región rostral de embrión, se observó el ectodermo, la placa neural, el notocordio, el mesodermo paraxial y el las crestas endodermales laterales. Existe una región del techo del arquenterón que no posee recubrimiento endodermal. Esta región corresponde al GRP.

#### 5.2.2.8 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA TEMPRANA (ESTADIO 14) DE *E. callistomma*.

La figura 26A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de néurula temprana. En la néurula temprana (Fig. 26B) se observó la placa neural y los pliegues neurales elevados en los extremos de la placa neural. En la región rostral los pliegues fueron más prominentes. En la parte caudal el embrión se observó el blastoporo. En la sección transversal (Fig. 26C) se observó la placa neural, el notocordio y el mesodermo paraxial. Se observaron los límites de las crestas endodermales y se observó que una porción del techo del arquenterón no está cubierto por endodermo. En esta porción se observó que la superficie de

las células que está en contacto con el arquenterón posee pigmento, lo cual indica que esta región corresponde al GRP. La figura 26D corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de una sección transversal a través de una región más anterior del embrión. Se pudo diferenciar el ectodermo de piel del ectodermo de la placa neural. El límite entre el mesodermo paraxial y el notocordio se observó claramente. En esta sección sólo una pequeña parte del notocordio está expuesta y no está cubierta por el endodermo.

#### 5.2.2.9 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA MEDIA (ESTADIO 15) DE *E. callistomma*.

La figura 27A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de néurula media. La figura 27B muestra la néurula media. Se observó que los pliegues neurales se han acercado en la línea media del cuerpo. En la parte caudal del embrión se observó el blastoporo (Fig. 27C). En la figura 27D se observó los pliegues neurales. Las células de los pliegues neurales tienen forma alargada. Se pudo distinguir el notocordio. Las células del mesodermo paraxial no se observan claramente. Se observó que el endodermo recubre totalmente al arquenterón.

#### 5.2.2.10 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA TARDÍA (ESTADIO 16.5) DE *E. callistomma*.

En la figura 28A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de néurula tardía. En la néurula tardía (Fig. 28B) se observó que los pliegues neurales se han

fusionado. En la parte posterior del embrión (Fig. 28C) se observó el blastoporo. En la tinción fluorescente de núcleos de una sección transversal (Fig. 28D) se observó que el tubo neural se ha formado y tiene forma cilíndrica. El tubo neural se encuentra en la región dorsal medial del embrión. Las células ectodermales del tubo neural son más alargadas que las células del ectodermo de piel. Además se observó el notocordio, los somitas y el recubrimiento endodermal del arquenterón.

#### 5.2.2.11 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE YEMA DE LA COLA (ESTADIO 17) DE *E. callistomma*.

La figura 29A es un esquema de la morfología externa de los embriones del estadio de yema de la cola. En el embrión entero del estadio de yema de la cola (Fig. 29B) se observó la presencia de la yema de la cola y la forma arqueada de los embriones, que se desarrollan sobre la masa de yema. En la cabeza, se pudo diferenciar los arcos branquiales: En sentido anterior-posterior, se observaron el arco mandibular, hioideo, branquial anterior y branquial posterior. También se observaron los pronefros. En la sección sagital (Fig. 29C) se observaron los somitas y el mesodermo paraxial en la parte posterior del embrión.

#### 5.2.2.12 MORFOLOGÍA DEL ESTADIO DE RESPUESTA MUSCULAR (ESTADIO 18) DE *E. callistomma*.

En este estadio los embriones mostraron contracciones del cuerpo en respuesta a estímulos mecánicos, característica principal de este estadio. En este estadio de respuesta

muscular (Fig. 30A) se observaron los arcos branquiales más desarrollados. Además se observaron los pronefros.

#### 5.2.2.13 MORFOLOGÍA DEL ESTADIO DE YEMA DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 19) DE *E. callistomma*.

En el embrión entero del estadio de yema de las branquias (Fig. 30B) se observó la presencia de la yema de las branquias, que sobresale del arco branquial anterior, característica que permitió determinar este estadio. Se observó el estomodeo en la zona rostral. Además se observó el arco mandibular, arco hioideo, arco braquial posterior, pronefros, somitas y la aleta caudal.

#### 5.2.2.14 MORFOLOGÍA DE LOS ESTADIOS DE DESARROLLO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 20 Y ESTADIO 21) DE *E. callistomma*.

La figura 31A corresponde a un esquema que muestra la ramificación de las branquias en el estadio 20. Las ramas de las branquias tanto posterior y anterior presentaron dos pequeñas ramificaciones. La figura 31B corresponde a un esquema que muestra la ramificación de las branquias en el estadio de desarrollo de las branquias (estadio 21). En el este estadio se observó que el primer y segundo par de branquias tienen 2 ramificaciones de mayor extensión que en el estadio 20. En el embrión entero en estadio de desarrollo de las branquias (estadio 20) (Fig. 31C) se observó las ramas anterior y posterior de las branquias tienen dos ramificaciones. Además se observó el estomodeo en la zona rostral. En este estadio los embriones presentaron

circulación en las branquias. En embrión entero en el estadio 21 (Fig. 31D) se observó que la rama posterior de las branquias tiene un desarrollo retardado en comparación con la rama anterior. La figura 31E corresponde a una magnificación de la cabeza del embrión en este estadio. Se observó con mayor claridad las ramificaciones de las ramas de las branquias y el estomodeo.

#### 5.2.2.15 MORFOLOGÍA DEL ESTADIO DE DESARROLLO COMPLETO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 23) DE *E. callistomma*.

La figura 32A corresponde a un esquema que muestra la ramificación de las branquias en el estadio de desarrollo completo de las branquias. En este estadio se observó que el primer par de branquias tiene 4 ramificaciones. El segundo par de branquias tiene 3 ramificaciones. En el embrión completo de estadio de desarrollo completo de las branquias (Fig. 32B) se observaron las branquias completamente desarrolladas. Además se observó el ojo del embrión y la transparencia de las aletas de la cola (Fig. 32C).

#### 5.2.2.16 MORFOLOGÍA DEL EMBRIÓN A LA ECLOSIÓN (ESTADIO 25) DE *E. callistomma*.

Los embriones de *E. callistomma* iniciaron su etapa de vida libre desde este estadio. En el embrión entero a la eclosión (Fig. 33A) no se observaron branquias externas. Se observó externamente el ojo, los somitas y la transparencia de las aletas de la cola. En la vista ventral

del embrión (Fig. 33B) se observó que el opérculo ha cubierto totalmente a las branquias. En el acercamiento ventral de la cabeza (Fig. 33C) se observó el disco oral en desarrollo.

## 6. DISCUSIÓN

En este estudio se describe y compara el desarrollo temprano de *H. fleischmanni* y *E. callistomma* (Anura: Centrolenidae) desde el clivaje hasta la eclosión del renacuajo. El desarrollo de las dos especies fue dividido en 25 estadios, para facilitar la descripción de desarrollo embrionario temprano. La descripción del desarrollo propuesta permite observar los cambios morfológicos externos que atraviesan los embriones de *H. fleischmanni* y *E. callistomma* durante el desarrollo, y permite la comparación con otras tablas elaboradas para otras especies realizadas por Nieuwkoop y Faber (1994) y Gosner (1960) (Tabla 3). Los estadios descritos desde el clivaje hasta la néurula temprana se homologaron con los estadios propuestos en la tabla de desarrollo de *X. laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994). Para los estadios desde néurula a la eclosión se utilizó la tabla general del desarrollo de anfibios (Gosner, 1960), debido a que durante estos estadios la morfología de los embriones contrasta con la forma de los embriones *X. laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994). Similar observación se ha reportado para *E. machalilla* y las ranas del género *Engystomops* (del Pino *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2009).

El presente estudio es un aporte al conocimiento sobre los anuros presentes en el Ecuador y a los estudios comparativos que se realizan en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE.

## 6.1. EL DESARROLLO TEMPRANO DE *H. fleischmanni* Y *E. callistomma*.

### 6.1.1. MORFOLOGÍA DEL CLIVAJE Y BLÁSTULA DE *H. fleischmanni* Y *E. callistomma*.

Los embriones de *H. fleischmanni* y *E. callistomma* fueron analizados desde el estadio de 32 células. No se obtuvieron embriones en los estadios más tempranos debido a la carencia de posturas.

En el estadio de 32 células en ambas especies presentaron características similares. Los blastómeros animales son más pequeños en comparación con los blastómeros vegetales que tienen un mayor tamaño (Figs. 2B y 18B), similar a lo observado en *X. laevis* (Hausen y Riebesell, 1991). La diferencia en el tamaño de los blastómeros está relacionada con la división holoblástica que establece dos regiones: una región embrionaria de blastómeros animales pequeños (micrómeros) que se divide rápidamente y una región de blastómeros vegetales grandes (macrómeros) que se divide más lentamente (Beams y Kessel, 1976). En la vista interna se observó que el blastocele tiene un tamaño pequeño en ambas especies (Figs. 2D y 18D).

En el estadio de blástula se observó que el blastocele está desplazado hacia el polo animal (Figs. 3D y 19D) al igual que en *X. laevis* (Hausen y Riebesell, 1991).

### 6.1.2 MORFOLOGÍA DE LA GÁSTRULA Y MODO DE GASTRULACIÓN

DE *H. fleischmanni* Y *E. callistomma*.

El inicio de la gastrulación se evidencia por la formación del labio dorsal del blastoporo (Gilbert, 2003) (Anexo 1). En gástrula temprana de *H. fleischmanni* y *E. callistomma* fue posible observar el labio dorsal del blastoporo en la región subecuatorial. Además, en este estadio se observaron las células de botella. Estas características morfológicas son similares a las observadas en *X. laevis* (Gilbert, 2003). Este cambio de forma en las células es producido por la constricción apical de las células que forman el labio dorsal del blastoporo y es el responsable del inicio de la involución (Keller *et al.*, 2003).

El movimiento de rotación vegetal es el factor más importante para la internalización del endodermo y mesodermo (Winklbauer y Schürfeld, 1999). En la gástrula media de *H. fleischmanni* y *E. callistomma* se observó el posible efecto de este movimiento sobre las células del piso del blastocele ya que se encontraron células cubriendo el techo del blastocele. Además, en el lado dorsal de la gástrula temprana (estadio 11) de *H. fleischmanni* y *E. callistomma* se observó claramente una línea que limita las células vegetales internas y las células de superficiales. Esta línea corresponde al cleft de Brachet (Figs. 6C y 21C).

El proceso de reducción del número de capas de células que conforman el techo del blastocele está guiado por el movimiento de epíbole (Gilbert, 2003). En la gástrula media se observó que en *H. fleischmanni* y *E. callistomma* el techo del blastocele se ha reducido hasta tener un grosor de 2 capas de células, al igual que en *X. laevis* (Keller, 1980).

La formación del arquenterón tiene lugar durante la gastrulación. Los eventos de inflación y elongación del arquenterón son independientes entre sí (Ewald *et al.*, 2004). Se observó que estos eventos ocurren de manera simultánea en la gastrulación de *H. fleischmanni*. En *E. callistomma* se observó que la elongación del arquenterón ocurre antes que la inflación, como en *X. laevis*. La inflación del arquenterón, posiblemente, es el resultado del influjo de líquido proveniente del blastocele (Ewald *et al.*, 2004).

En la gástrula media de *H. fleischmanni* y *E. callistomma* se observó que las cavidades del blastocele y el arquenterón están separadas por un tabique de células, al igual que en *X. laevis* (Ewald *et al.*, 2004). Además, tanto en *H. fleischmanni* y *E. callistomma* se observó que la inflación y elongación del arquenterón ocurre simultáneamente con la reducción de tamaño del blastocele. El blastocele desaparece, casi por completo, hacia el final de la gastrulación, al igual que en *X. laevis* (Ewald *et al.*, 2004).

En los estadios de gástrula tardía y post-gástrula de ambas especies se observó la presencia del notocordio y el mesodermo paraxial, al igual que ocurre en *X. laevis*. En *X. laevis*, la presencia del mesodermo paraxial y notocordio está íntimamente ligado con los movimientos morfogénéticos de convergencia y extensión que ocurren durante la gastrulación (revisado por Pourquoié, 2001).

El análisis de la expresión de la proteína Brachyury sería necesario para confirmar que los tejidos sufren convergencia y extensión dorsal durante estos estadios. El gen *Brachyury* juega un rol importante en los movimientos morfogénéticos durante la gastrulación y se expresa en los tejidos que sufren convergencia y extensión dorsal (Smith *et al.*, 1991; Yamada, 1994).

Una de las características más llamativas en la gastrulación de *H. fleischmanni* y *E. callistomma* es la tendencia a mantener el tapón de yema en el estadio de post- gástrula. El tiempo desde el inicio hasta el final de la gastrulación es similar. En *H. fleischmanni* es de 24 horas aproximadamente y en *E. callistomma* es de 22 horas aproximadamente (Tabla 4).

Las características morfológicas observadas en la gástrula de las dos especies analizadas permitieron la comparación con los modos de gastrulación determinados a partir de estudios comparativos realizados en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE. Estos estudios comparativos determinaron tres modos de gastrulación en diferentes especies de anuros (Anexo 2).

En el primer modo de gastrulación se encuentran las ranas *X. laevis*, *E. coloradorum* y *E. randi* caracterizadas por presentar desarrollo rápido. En estas especies con desarrollo rápido, la elongación de arquenterón inicia en la gástrula temprana y el alargamiento del notocordio se inicia en la gástrula media (Moya *et al.*, 2007; del Pino *et al.*, 2007).

El segundo modo de gastrulación incluye a las ranas dendrobátidas y a *Eleutherodactylus coqui* (revisado por del Pino *et al.*, 2007). En estas especies, la elongación del arquenterón se inicia de forma ligeramente más tardía, en la gástrula media; mientras que el alargamiento de notocordio inicia en la post-gástrula.

El tercer modo de gastrulación se observa en *G. riobambae*. En esta rana la elongación del arquenterón y el alargamiento del notocordio están retrasados hasta la post-gástrula (Moya *et al.*, 2007). La involución es el mayor evento en la gástrula de *G. riobambae* (Moya *et al.*, 2007). Además, esta es la única especie que forma un disco embriónico. La formación de un disco embriónico en *G. riobambae* está asociado con el retraso en la elongación del arquenterón

y la acumulación de las células que involucionan en el labio del blastoporo. Esto resulta en la formación de un collar circumblastoporal en la gástrula tardía (Moya *et al.*, 2007).

Las características observadas en la gástrula de *H. fleischmanni* y *E. callistomma*, como el inicio de la elongación de arquenterón en la gástrula temprana y el inicio del alargamiento del notocordio en la gástrula media sugieren que presentan el primer modo de gastrulación y por lo tanto se las podría caracterizar como ranas de desarrollo rápido.

### 6.1.3 MORFOLOGÍA DE LA NÉURULA DE *H. fleischmanni* Y *E. callistomma*.

La neurulación es un proceso en el cual los precursores del sistema nervioso central son formados, separados y llevados debajo de la epidermis (Davidson y Keller, 1999). Los primeros indicios del inicio de la neurulación corresponden a la formación de los pliegues neurales en los bordes de la placa neural (Harrington *et al.*, 2009). En *H. fleischmanni* y *E. callistomma* la placa neural es visible en el estadio de post-gástrula al igual que en *X. laevis* (Harrington *et al.*, 2009).

La morfología neural observada en *H. fleischmanni* y *E. callistomma*, concuerda con los patrones descritos para *X. laevis* (Harrington *et al.*, 2009). En las tres especies, la placa neural se observa en la néurula temprana. En la néurula media los pliegues neurales se elevan en los bordes de la placa neural. En la néurula tardía los pliegues neurales se fusionan y el tubo neural se cierra (Anexo 3).

En la néurula temprana de *H. fleischmanni* se observó que la placa neural es más gruesa en comparación a *E. callistomma* y los pliegues neurales son más prominentes en *H. fleischmanni*. En ambas especies, se observó que las células de la placa neural se alargan durante la post-gástrula y mantienen esta forma hasta la néurula tardía al igual que ocurre en *X. laevis* (Harrington *et al.*, 2009). En las dos ranas centrolénidas se observa la compactación de las células en los pliegues neurales, durante la néurula media.

#### 6.1.3.1. PRESENCIA DE GRP EN LA NÉURULA DE *H. fleischmanni*

Y *E. callistomma*.

La presencia de GRP se muestra en *H. fleischmanni* y en *E. callistomma* en el estadio de post-gástrula (Fig. 11C y 25C). En las secciones transversales de las dos especies es posible observar los límites de las crestas endodermales laterales y entre estas el mesodermo superficial correspondiente al GRP. En una sección transversal de la néurula temprana de *E. callistomma* se observó el pigmento del mesodermo superficial, que resulta de las células mesodermales pigmentadas externas que durante la gastrulación fueron internalizadas. Se observa además que en la parte más rostral del embrión el recubrimiento endodermal del arquenterón es casi completo con sólo unas pocas células del notocordio sin cubrir. Estos resultados sugieren que estas especies como en los anfibios antes analizados el GRP es una estructura conservada (Sáenz-Ponce *et al.*, 2012; Shook *et al.*, 2004). Esto indica la importancia de esta estructura para especificación de la simetría izquierda-derecha de los órganos del cuerpo, como en otros vertebrados (Blum *et al.*, 2009).

#### 6.1.4 MORFOLOGÍA DE LOS EMBRIONES DE *H. fleischmanni* Y *E. callistomma* DESDE EL ESTADIO DE YEMA DE LA COLA (ESTADIO 17) HASTA LA ECLOSIÓN DEL RENACUAJO (ESTADIO 25).

Durante los estadios avanzados del desarrollo embrionario, la diferenciación de las capas germinales determina la formación de los órganos futuros de los organismos (Wolpert *et al.*, 2007). En *H. fleischmanni* y *E. callistomma* una vez finalizada la neurulación se observaron los somitas y los pronefros que son estructuras derivadas del mesodermo. Los pronefros se observaron a cada lado de los embriones al igual que en *X. laevis* (Asashima *et al.*, 2009; Drawbridge *et al.*, 2003).

En los estadios más avanzados del desarrollo se observa el desarrollo de las branquias hasta la eclosión del renacuajo. La ramificación de las branquias es característica de cada especie. Para *H. fleischmanni* en el estadio de desarrollo completo de las branquias se observaron 5 ramificaciones en la rama anterior de las branquias y 4 en la rama posterior y para *E. callistomma* en el mismo estadio, la rama anterior de las branquias presenta 4 ramificaciones y la rama posterior 3 ramificaciones. A diferencia de lo mencionado por Gosner (1960) el ojo no se observa con claridad hasta el estadio 23. Es posible que el color de los embriones no permita diferenciar con claridad el ojo en estadios anteriores. Los embriones a la eclosión presentan una ligera diferencia. En *H. fleischmanni* los embriones al eclosionar presentan branquias exteriores a un lado. En *E. callistomma* no se observan branquias exteriores en este estadio. El opérculo a cubierto por completo a las branquias (Gosner, 1960).

## 6.2 PIGMENTACIÓN DEL HUEVO Y TIEMPOS DEL DESARROLLO TEMPRANO DE *H. fleischmanni* Y *E. callistomma*.

Las ranas *H. fleischmanni* y *E. callistomma* presentan similares características morfológicas en el desarrollo embrionario. Sin embargo, presentan diferencias en cuanto a la pigmentación de los huevos y el tiempo de desarrollo desde la fertilización hasta la eclosión.

Los huevos de *H. fleischmanni* y *E. callistomma* son depositados en masas gelatinosas en hojas sobre corrientes de agua. Luego de eclosionar, los renacuajos caen al agua donde terminan su desarrollo (Delia *et al.*, 2010 y Jacobson, 1985). En las dos especies el diámetro promedio del huevo es de 2,1 mm.

La pigmentación en el hemisferio animal de los huevos es considerada una protección a la radiación UV. Además, la coloración oscura puede proveer camuflaje contra los depredadores terrestres. En contraste, los huevos y embriones son despigmentados en ranas que se desarrollan en lugares ocultos, como es el caso de las ranas hemifráctidas (Schmid *et al.*, 2012). En *X. laevis* Shroom2, un regulador de la  $\gamma$ -tubulina, tiene un rol importante en la inducción de gránulos de pigmento en los oocitos y blastómeros de *X. laevis* (Lee *et al.*, 2009). En contraste con *X. laevis*, los huevos y los embriones tempranos de *Physalaemus pustulosus* (family Leiuperidae) son blancos, y la cantidad de mRNA materno de Shroom2 es muy baja en comparación con los huevos de *X. laevis* (Lee *et al.*, 2009; Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Por lo tanto, la pigmentación en los huevos de otras ranas puede posiblemente depender de los niveles de expresión de Shroom2 en la oogénesis (Lee *et al.*, 2009).

Los huevos de *H. fleischmanni* son blancos-ligeramente verdosos. La carencia de pigmento en los embriones de esta especie podría estar relacionada con el lugar de oviposición. Los huevos de *H. fleischmanni* son depositados en el envés de las hojas (Delia *et al.*, 2010). Por tal motivo, no están expuestos a la radiación UV que puede causar severos daños en el desarrollo embrionario o la muerte de los embriones (Gurdon, 1960). Además, al estar en el envés de las hojas los embriones están ocultos y no requieren de camuflaje como en el caso de los huevos depositados en el agua como los de *X. laevis* (revisado en Elinson y del Pino, 2012). En contraste, los huevos de *E. callistomma* poseen una coloración marrón, la pigmentación decrece a lo largo del eje animal-vegetal. La especie *E. callistomma* deposita sus huevos en el haz de las hojas (Guayasamín y Trueb, 2007), donde están más expuestos a la radiación solar y a la depredación, por lo que necesitan pigmento que los proteja de la radiación UV y camuflaje que los proteja de ser depredados (revisado en Elinson y del Pino, 2012).

En los embriones de *H. fleischmanni* no se observó pigmento alrededor de los núcleos de las células como lo reportado para *Engystomops* (Romero *et al.*, 2009). Sin embargo, el análisis de los niveles de expresión de *Shroom2* en los embriones de *H. fleischmanni* y *E. callistomma* es necesario para determinar la presencia y localización de los gránulos de pigmento y compararlos con lo encontrado en *X. laevis* y *E. pustulosus*.

Las especies analizadas también presentan diferencias en los tiempos del desarrollo. Los tiempos del desarrollo para las dos especies no fueron medidos bajo temperatura constante. (Tabla 1 y Tabla 2). La tasa del desarrollo depende de la temperatura (revisado en Duellman y Trueb, 1994). Por este motivo, se sugiere la realización de experimentos controlados para demostrar de qué forma la temperatura afecta al desarrollo de estas especies. Los tiempos del desarrollo proporcionados en la tabla 1 y la tabla 2 son aplicables únicamente al estudio a

temperatura ambiente del laboratorio que fluctúa entre 18 °C y 22°C y representan el producto de las observaciones a lo largo de esta investigación. Estos datos no son aplicables a estudios de campo donde las condiciones ambientales son distintas.

Los tiempos del desarrollo obtenidos para las dos especies estudiadas muestran que *H. fleischmanni* tarda desde la fertilización hasta la eclosión aproximadamente 5 días. Mientras que *E. callistomma* tarda aproximadamente 12 días (Tabla 4). La diferencia que presentan las especies analizadas en los tiempos del desarrollo contrasta con la similitud de tiempos del desarrollo observada en ranas de la familia Dendrobatidae (del Pino *et al.*, 2004). Sería interesante documentar los tiempos del desarrollo bajo temperatura controlada y además analizar los tiempos del desarrollo en otras especies de la familia Centrolenidae y compararlos los resultados obtenidos en esta investigación.

### **6.3 LA IMPORTANCIA DE LA MODULARIDAD EN EL DESARROLLO TEMPRANO DE RANAS CON DISTINTAS ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS.**

El estudio comparativo del desarrollo temprano en distintas especies de ranas ha permitido observar la modularidad en los procesos de desarrollo que difieren en el tamaño de huevo y estrategia reproductiva (Moya *et al.*, 2007). La rana modelo del desarrollo *X. laevis* tiene un huevo de 1,2 mm de diámetro y su estrategia reproductiva consiste en depositar los huevos en al agua. En las *E. randi* y *E. coloradorum* el tamaño del huevo es de 1,1 a 1,3 mm de diámetro y su estrategia reproductiva consiste en depositar los huevos en nidos de espuma.

Tanto *X. laevis*, *E. randi* y *E. coloradorum* se consideran especies de desarrollo rápido de acuerdo a su modo de gastrulación (del Pino *et al.*, 2007).

En la rana *E. machalilla* el diámetro del huevo es de 1,6 mm de diámetro y su estrategia reproductiva es el cuidado parental por parte del macho. La rana *G. riobambae* tiene un tamaño de huevo de 3.0 mm y su estrategia reproductiva es incubar los huevos en una bolsa marsupial. Estas especies de acuerdo al modo de gastrulación que presentan son consideradas ranas de desarrollo lento (del Pino *et al.*, 2007).

En el presente estudio las especies *H. fleischmanni* y *E. callistomma* presentan huevos con un tamaño aproximado de 2,1 mm y su estrategia reproductiva consiste en depositar los huevos en masas gelatinosas en hojas sobre corrientes del agua. En estas especies pertenecientes a la misma familia se propone caracterizarlas como especies de desarrollo rápido de acuerdo a su modo de gastrulación.

En la rana *H. fleischmanni* la alta tasa de depredación especialmente efectuada por las larvas de las moscas del género *Drosophila* (Villa, 1977), la baja tasa supervivencia de los embriones entre 21 al 38% y otros factores que aumentan la mortalidad de los embriones (Hayes, 1991), podrían estar influenciando la adaptación de poner huevos que se desarrollen lo más pronto posible para evitar ser depredados. Para la rana *E. callistomma* no existe suficiente información ecológica que permita concluir la adaptación al desarrollo rápido.

El presente estudio refuerza la idea de que la estrategia reproductiva es el acontecimiento que determina el tiempo de gastrulación (del Pino *et al.*, 2007) y no el tamaño del huevo.

#### **6.4. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA DE LOS EMBRIONES DE *H. fleischmanni* Y *E. callistomma*.**

La descripción del desarrollo temprano desde el clivaje hasta la eclosión de *H. fleischmanni* y *E. callistomma* es un aporte a los estudios comparativos que se realizan en el Laboratorio de Biología de la PUCE. Es interesante estudiar las ranas de la familia Centrolenidae ya que se pueden realizar comparaciones con ranas de diferentes familias previamente analizadas.

Las características morfológicas observadas en la gastrulación de las especies analizadas en este trabajo como lo son, el inicio de la elongación del arquenterón en la gástrula temprana y el inicio del alargamiento del cuerpo en la gástrula tardía sugieren que el modo de gastrulación de estas especies concuerda con el modo de gastrulación que presentan *X. laevis*, *E. coloradorum* y *E. randi*, y por lo tanto se les ha caracterizado como especies de desarrollo rápido (del Pino *et al.*, 2007). Sin embargo, es necesario realizar análisis moleculares en *H. fleischmanni* y *E. callistomma* que confirmen lo observado morfológicamente.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran la presencia de GRP en la néurula de las especies analizadas. La presencia del GRP tanto en las ranas analizadas en este trabajo como en ranas previamente estudiadas sugieren que esta estructura es altamente conservada en los anfibios para la determinación de la simetría izquierda-derecha (Sáenz-Ponce *et al.*, 2012; Shook *et al.*, 2004).

La descripción morfológica del desarrollo temprano de estas especies incrementa el conocimiento del desarrollo embrionario de los anuros presentes en el Ecuador. Este estudio es

una herramienta para futuros estudios comparativos que se realizan en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE.

## 7. LITERATURA CITADA

Asashima, M., Ito, Y., Chan, T., Michue, T., Nakanishi, M., Suzuki, K., Hitachi, K., Okabayashi, K., Kondow, A. y Ariizumi, T. 2009. In vitro organogenesis from undifferentiated cells in *Xenopus*. *Developmental Dynamics* 238:1309–1320.

Beams, H. y Kessel, R. 1976. Cytokinesis: A comparative study of cytoplasmic division in animal cells. *American Scientist* 64:279–290.

Blum, M., Weber, T. y Beyer, T. 2009. Evolution of leftward flow. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20: 464-471.

Colas, J.F. y Schoenwolf, G.C. 2001. Towards a Cellular and Molecular Understanding of Neurulation. *Developmental Dynamics* 221: 117-145.

Dale, L. 1999. Vertebrate development: Multiple phases to endoderm formation. *Current Biology* 9: 812-815.

Davidson, L. y Keller, R. 1999. Neural tube closure in *Xenopus laevis* involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension. *Development*. 126: 4547-4556.

del Pino, E. M. y Loor-Vela, S. 1990. The pattern of early cleavage of the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. *Development* 110: 781–789.

del Pino, E. M., Ávila, M., Pérez, O., Benítez, M., Alarcón, I., Noboa, V., y Moya, I. 2004. Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *International Journal of Developmental Biology* 48: 663-670.

del Pino, E.M., Venegas-Ferrín, M., Romero. Carvajal, A., Montenegro-Larrea, P., Saénz-Ponce, N., Moya, I.M., Alarcón, I., Sudou, N., Yamamoto, S. y Taria, M. 2007. A comparative analysis of frog early development. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 11882-11888.

Delia, J., Cisneros-Heredia, D., Whitney, J. y Murrieta-Galindo, R. 2010. Observations on the Reproductive Behavior of a Neotropical Glassfrog, *Hyalinobatrachium fleischmanni* (Anura: Centrolenidae). *South American Journal of Herpetology* 5:1-12.

Drawbridge, J., Meighan, C. M., Lumpkins, R. y Kite, M. E. 2003. Pronephric Duct Extension in Amphibian Embryos: Migration and Other Mechanisms. *Developmental Dynamics* 226:1–11.

Duellman W., Trueb L. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, New York.

Duellman, W. 1992. Reproductive Strategies of Frogs. *Scientific American* 267: 58–65.

Duellman, W. y Trueb, L. 1994. *Biology of Amphibians*. The John Hopkins University Press. Baltimore, USA.

Elinson, R. y del Pino, E.M. 2012. Developmental diversity of amphibians. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 1:345–369.

Ewald, A.J., Peyrot, S.M., Tyszka, J.M., Fraser, S.E. y Wallingford, J.B. 2004. Regional requirements for Dishevelled signaling during *Xenopus* gastrulation: separable effects on blastopore closure, mesendoderm internalization and archenteron formation. *Development* 131: 6195-6209.

Gárces, A. 2012. Expresión de la proteína vegt en embriones tempranos de las ranas *Engystomops randi* y *Epipedobates machalilla* en comparación con *Xenopus laevis*. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Gatherer, D. y del Pino, E. M. 1992. Somitogenesis in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. *International Journal of Developmental Biology* 36: 283-291.

Gilbert, S. F. 2003. *Developmental Biology*. Seventh Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.

Gomez-Mestre, I., Pyron, R. A. y Wiens, J. 2012. Phylogenetic analyses reveal unexpected patterns in the evolution of reproductive modes in frogs. *Evolution* 66: 3687–3700.

Gont, L.K., Steinbeisser, H., Blumberg, B. y De Robertis, E.M. 1993. Tail formation as a continuation of gastrulation: the multiple cell populations of the *Xenopus* tailbud derive from the late blastopore lip. *Development* 119: 991-1004.

Gorny, A-K. y Steinbeisser, H. 2012. Brachet's cleft: a model for the analysis of tissue separation in *Xenopus*. *Development Biology* 1: 294–300.

Gosner, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.

Greene, N. y Copp, A.J. 2009. Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. *Prenatal Diagnosis* 29: 303-311.

Guayasamín, J. M. y Trueb, L. 2007. A new species of glassfrog (Anura: Centrolenidae) from the lowlands of northwestern Ecuador, with comments on centrolenid osteology. *Zootaxa* 1447: 27-45.

Gurdon, J. 1960. The effects of ultraviolet irradiation on uncleaved eggs of *Xenopus laevis*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*. 101: 299-311.

Haddad, C. F. B. y Prado, C. P. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *Bioscience* 55: 207–212.

Hardin J. y Keller R. 1988. The behaviour and function of bottle cells during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Development* 103: 211-230.

Harrington, M.J., Hong, E. y Brewster, R. 2009. Comparative analysis of neurulation: First impressions do not count. *Molecular Reproduction & Development* 76: 954-965.

Hausen, P. y Riebesell, M. 1991. *The Early Development of Xenopus laevis: An atlas of the histology*. Springer-Verlag, Alemania.

Hayes, M. 1991. A study of clutch attendance in the neotropical frog *Centrolenella fleischmanni* (Anura: Centrolenidae). PhD thesis, University of Miami, Coral Gables, USA.

Heasman, J. 2006. Patterning the early *Xenopus* embryo. *Development* 133: 1205-1217.

Hervas, F. 2012. Morfología, estructura interna y somitogénesis de los embriones de *Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates auratus* (Anura: Dendrobatidae) desde la néurula hasta la eclosión del renacuajo. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Jacobson, S. 1985. Reproductive behavior and male mating success in two species of glass frogs (Centrolenidae). *Herpetologica* 41: 396-404

Keller, R. 1980. The cellular basis of epiboly: an SEM study of deep-cell rearrangement during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Journal of embryology and experimental morphology*. 60: 201-234.

Keller, R. 1996. Early Embryonic Development of *Xenopus laevis*. *International Review of Cytology. Methods in cell Biology Xenopus laevis: Practical uses in Cell and Molecular Biology* 36. Academic Press, San Diego-California, USA.

Keller, R. 1999. The Origin and Morphogenesis of amphibian somites. *Current Topics in Developmental Biology* 47:33–96.

Keller, R. E., Danilchik, M., Gimlich, R. y Shih, J. 1985. The function and mechanism of convergent extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Journal of embryology and experimental morphology* 89: 185–209.

Keller, R. y Danilchik, M. 1988. Regional expression, pattern and timing of convergence and extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Development*. 103: 193-209.

Keller, R. y Shook, D. 2004. Gastrulation in Amphibians. En: *Gastrulation: From cell to Embryo* (C. Stern, Ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. E.E.U.U.

Keller, R., Davidson. L. y Shook, D. R. 2003. How we are shaped: The biomechanics of gastrulation. *Differentiation* 71: 171–205.

- Kielbówna, L. 1981. The formation of somites and early myotomal myogenesis in *Xenopus laevis*, *Bombina variegata* and *Pelobates fuscus*. *Journal of Embryology &*
- Krneta-Stankic, V., Sabillo, A. y Domingo, C.R. 2010. Temporal and spatial patterning of axial myotome fibers in *Xenopus laevis*. *Developmental Dynamics* 239: 1162-1177.
- Kumano, G., y Smith, W.C., 2002. Revisions to the *Xenopus* gastrula fate map: implications for mesoderm induction and patterning. *Developmental Dynamics* 225: 409-421.
- Lee C, Le M. P, Cannatella, D. y Wallingford, J. B. 2009. Changes in localization and expression levels of Shroom2 and spectrin contribute to variation in amphibian egg pigmentation patterns. *Development Genes and Evolution* 219:319-330.
- López, M. 2012. Expresión de la proteína mix1 en embriones tempranos de las ranas *Engystomops randi* y *Epipedobates machalilla* en comparación con *Xenopus laevis*. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Moya, I., Alarcón, I. y del Pino, E. M. 2007. Gastrulation of *Gastrotheca riobambae* in comparison with other frogs. *Developmental Biology* 304: 467–478.
- Myers, C. D., Sepich, S. D. y Solnica-Krezel, L. 2002. Convergence and extension in vertebrate gastrulae: cell movements according to or in search of identity? *Trends in Genetics* 18: 447–455.

Newport, J. y Kirschner, M. 1982. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* 30: 675-686.

Nieuwkoop, P. y Faber, J. 1994. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing. New York.

Pourquié, O. 2001. Vertebrate Somitogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17: 311-350.

Radice, G., Neff, A., Shim, Y. H., Brustis, J. y Malacinski, G. 1989. Developmental histories in amphibian myogenesis. *International Journal of Developmental Biology* 33: 325-343.

Romero-Carvajal, A., Sáenz-Ponce, N., Venegas-Ferrín, M., Almeida-Reinoso, D., Lee, C., Bond, J., Ryan, M., Wallingford, J y del Pino, E.M. 2009. Embryogenesis and laboratory maintenance of the foam-nesting túngara frogs, genus *Engystomops* (= *Physalaemus*). *Developmental Dynamics* 238:1444–1454.

Sáenz-Ponce, N., Santillana-Ortiz, J.D. y del Pino, E.M. 2012. The gastrocoel roof plate in embryos of different frogs. *Differentiation* 83: 62–66.

Savage, J. 2002. *The Amphibians and Reptiles of Costa Rica*. University of Chicago Press. Chicago.

Shook, D.R., Majer, C. y Keller, R. 2004. Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species. *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Developmental Biology* 270: 163-185.

Schmid, M., Steinlein, C., Bogart, J.P., Feichtinger, W.; Haaf, T., Nanda, I., del Pino, E.M., Duellman, W.E. y Hedges, S.B. 2012. The Hemiphractid Frogs Phylogeny, Embryology, Life History, and Cytogenetics. *Cytogenetic and Genome Research* 138: 69-384.

Smith, J.C., Price, B.M., Green, J.B., Weigel, D. y Hermann, B.G.1991. Expression of a *Xenopus* homolog of *Brachyury (T)* is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell* 67: 79-87.

Symes, K. y Smith, J. C. 1987. Gastrulation movements provide an early marker of mesoderm induction in *Xenopus laevis*. *Development* 101: 339-349.

Venegas-Ferrín, M., Sudou, N., Taira, M. y del Pino, E. M. 2010. Comparison of Lim1 expression in embryos of frogs with different modes of reproduction. *The International Journal of Developmental Biology* 54: 195-202.

Villa, J. 1977. A Symbiotic Relationship between Frog (Amphibia, Anura, Centrolenidae) and Fly Larvae (Drosophilidae). *Journal of Herpetology* 11: 317:322.

Warner, A. 1984. Physiological approaches to early development. *Recent Advances in Physiology* 10: 87-123.

Wells, K. 2007. *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press, Chicago.

Winklbauer, R. y Schürfeld, M. 1999. Vegetal rotation, a new gastrulation movement involved in the internalization of the mesoderm and endoderm in *Xenopus*. *Development* 126: 3703-3713.

Wolpert, L., Jessel, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., y Smith, J. 2007. *Principles of Development*. 3-edición. Oxford University Press, USA.

Yamada, T. 1994. Caudalization by the amphibian organizer: *Brachyury*, convergent extension and retinoic acid. *Development* 120: 3051-3062.

Yasuo, H. y Lemaire, P. 2001. Generation of the germ layers along the animal-vegetal axis in *Xenopus laevis*. *International Journal of Developmental Biology* 235: 229-235.

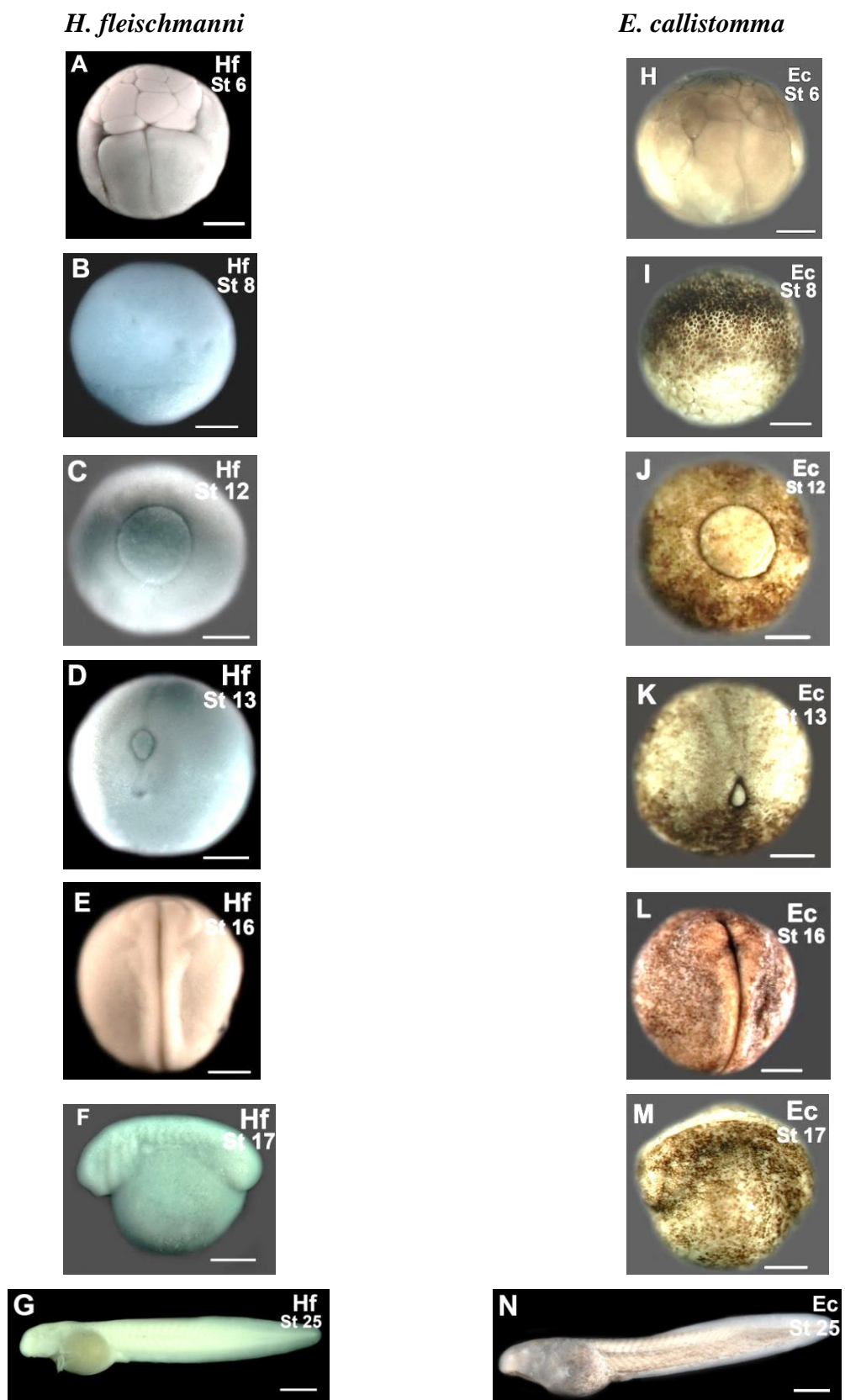
Zhang, J., Houston, D. W., King, M. L., Payne, C., Wylie, C. y Heasman, J. 1998. The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryos. *Cell* 94: 515-24.

## **8. FIGURAS**

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>a:</b> Arquenterón	<b>m:</b> Mesodermo
<b>aba:</b> Arco branquial anterior	<b>mp:</b> Mesodermo paraxial
<b>abp:</b> Arco branquial posterior	<b>n:</b> Notocordio
<b>ac:</b> Aleta de la cola	<b>o:</b> Ojo
<b>ah:</b> Arco hioideo	<b>pf:</b> Pronefros
<b>am:</b> Arco mandibular	<b>pln:</b> Pliegues neurales
<b>b:</b> Blastocelo	<b>pn:</b> Placa neural
<b>bp:</b> Blastoporo	<b>ra:</b> Rama anterior de las branquias
<b>br:</b> Branquias	<b>rp:</b> Rama posterior de las branquias
<b>ccb:</b> Collar circumblastoporal	<b>s:</b> Somita
<b>cs:</b> Capa sensorial del neuroectodermo	<b>sn:</b> Surco neural
<b>e:</b> Ectodermo	<b>so:</b> Estomodeo
<b>em:</b> Endomesodermo	<b>tn:</b> Tubo neural
<b>en:</b> Endodermo	<b>ty:</b> Tapón de yema
<b>grp:</b> Gastrocoel roof plate o placa del techo del arquenterón	<b>y:</b> Yema
<b>ld:</b> Labio dorsal del blastoporo	<b>yb:</b> Yema de las branquias
<b>lv:</b> Labio ventral del blastoporo	<b>yc:</b> Yema de la cola

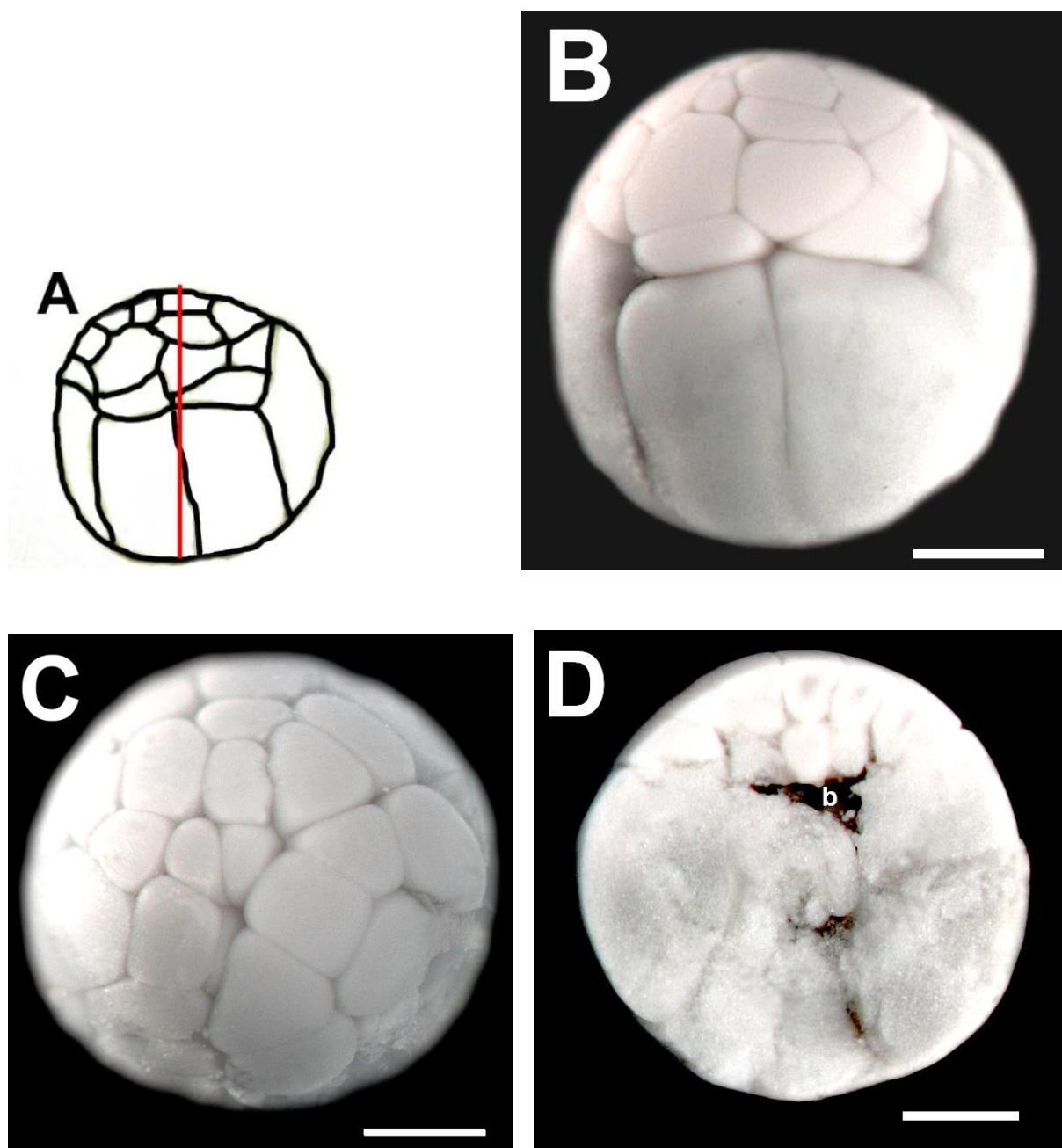
Fig. 1.



**Figura 1. Resumen del desarrollo temprano de *H. fleischmanni* y *E. callistomma*.**

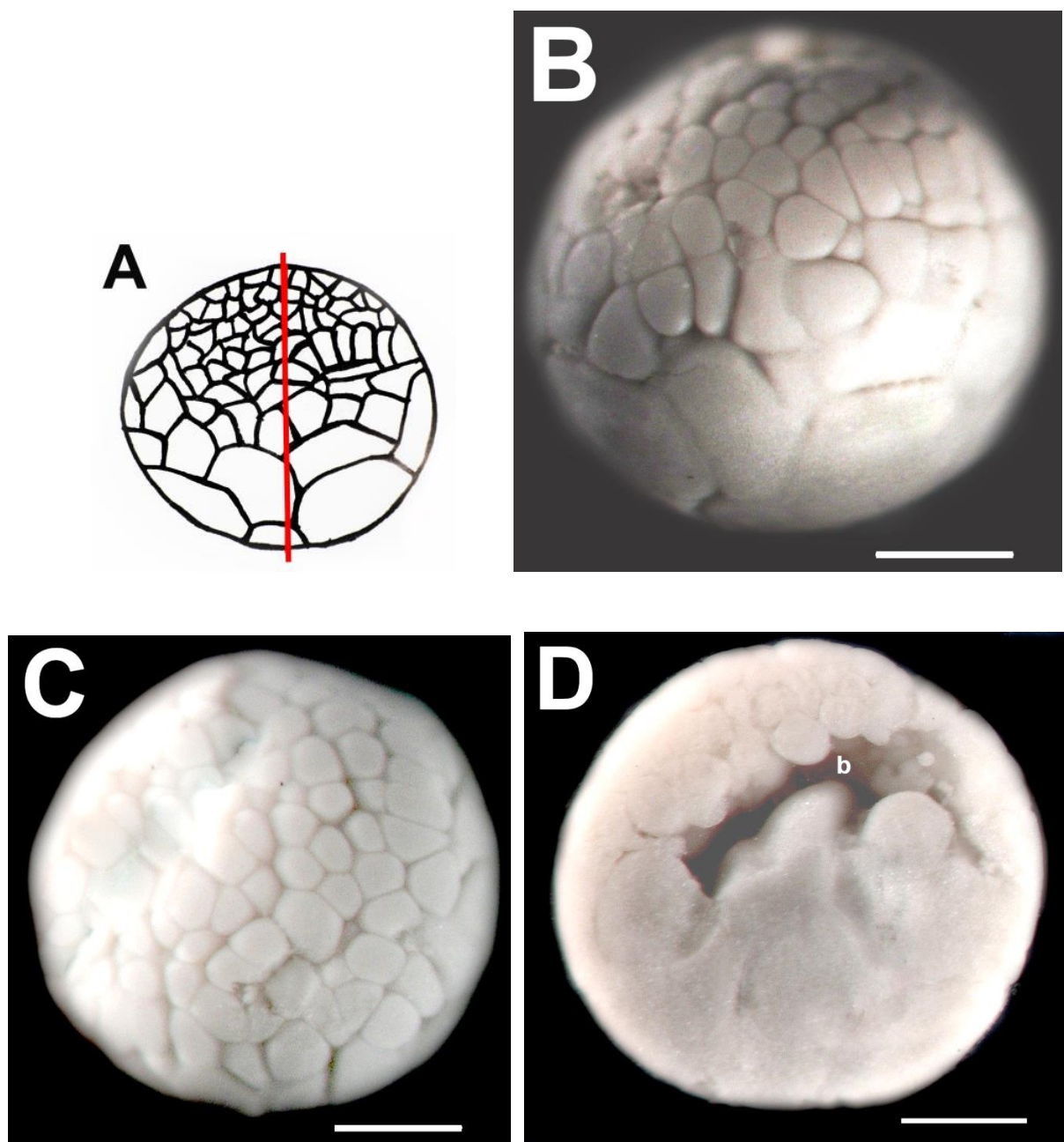
Las imágenes A-G resumen el desarrollo de *H. fleischmanni*, usando estadios representativos. Las imágenes H-N presentan los estadios homólogos de *E. callistomma*. A, B, F, G, H, I, M y N son vistas laterales. C, D, J y K son vistas posteriores. E y L son vistas dorsales de ambas especies. (A y H) Clivaje. (B e I) Blástula de células medianas, (C y J) Gástrula. Estadio tapón de yema mediano. (D y K) Post-gástrula. (E y L) Néurula tardía. Cerramiento del tubo neural. (F y M) Estadio de yema de la cola. (G y N) Estadio a la eclosión. Las barras en A, B, C, D, E, F, H, I, J, K, L y M corresponden a 500  $\mu\text{m}$ , en G y N corresponden a 1mm.

Fig. 2.

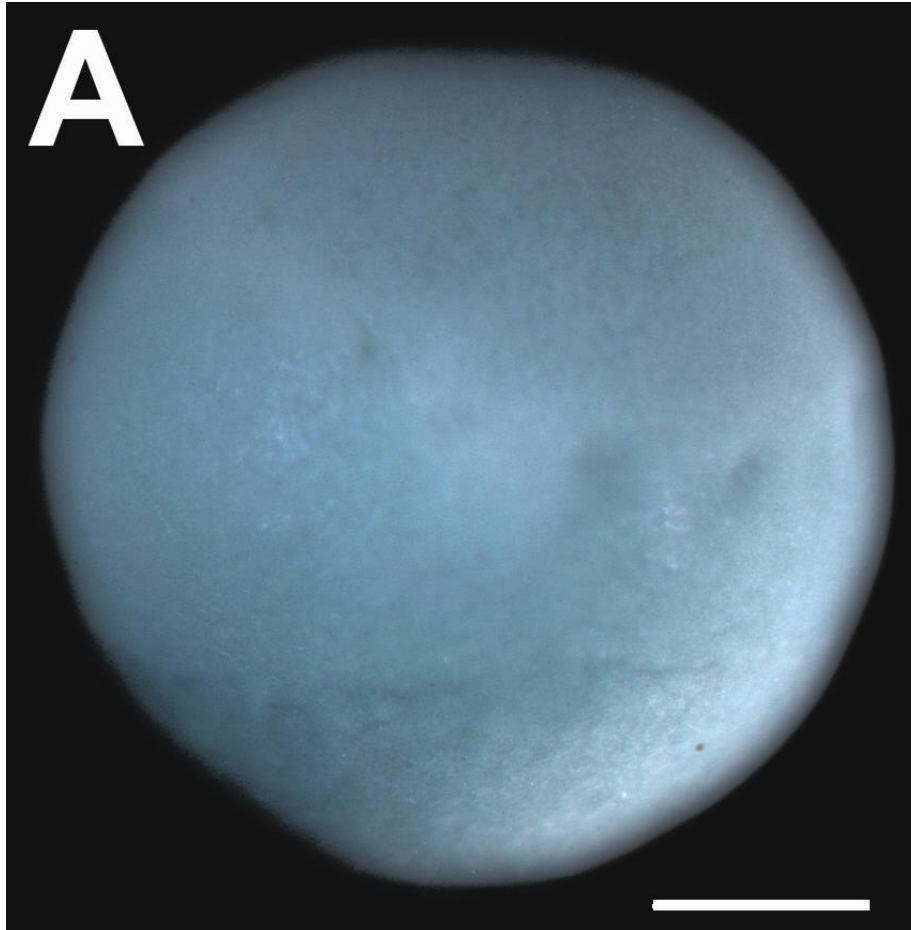


**Figura 2. Morfología del estadio de 32 células de *H. fleischmanni* (estadio 6):** A y B son vistas laterales. Hemisferio animal orientado hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la bisección sagital que se muestra en D. (B) Embrión en el estadio de 32 células. Vista externa. (C) Imagen del hemisferio animal. (D) Bisección sagital. Hemisferio animal orientado hacia arriba. Se observa el blastocele como una pequeña cavidad. No se observa pigmento alrededor de los núcleos de las células animales. Las barras en B, C, D corresponden a 500  $\mu\text{m}$ .

Fig. 3.

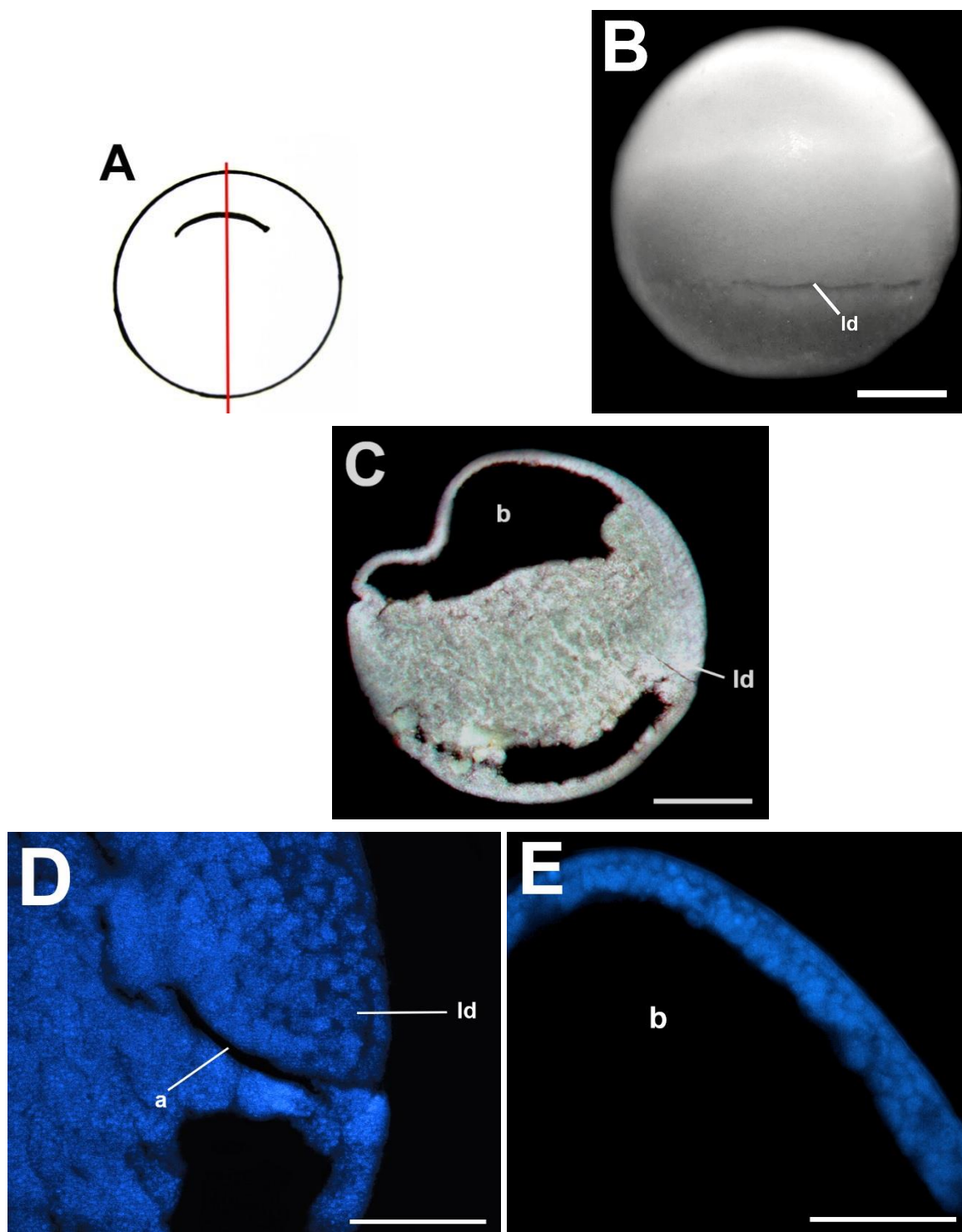


**Figura 3. Morfología del estadio de blástula de células grandes de *H. fleischmanni* (estadio 7):** A y B son vistas laterales. Hemisferio animal orientado hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la bisección sagital que se muestra en D. (B) Blástula de células grandes. Vista externa. (C) Imagen del hemisferio animal. (D) Bisección sagital. Hemisferio animal está orientado hacia arriba. El blastocele presenta una mayor extensión. Las barras en B, C, D corresponden a 500  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 4.**

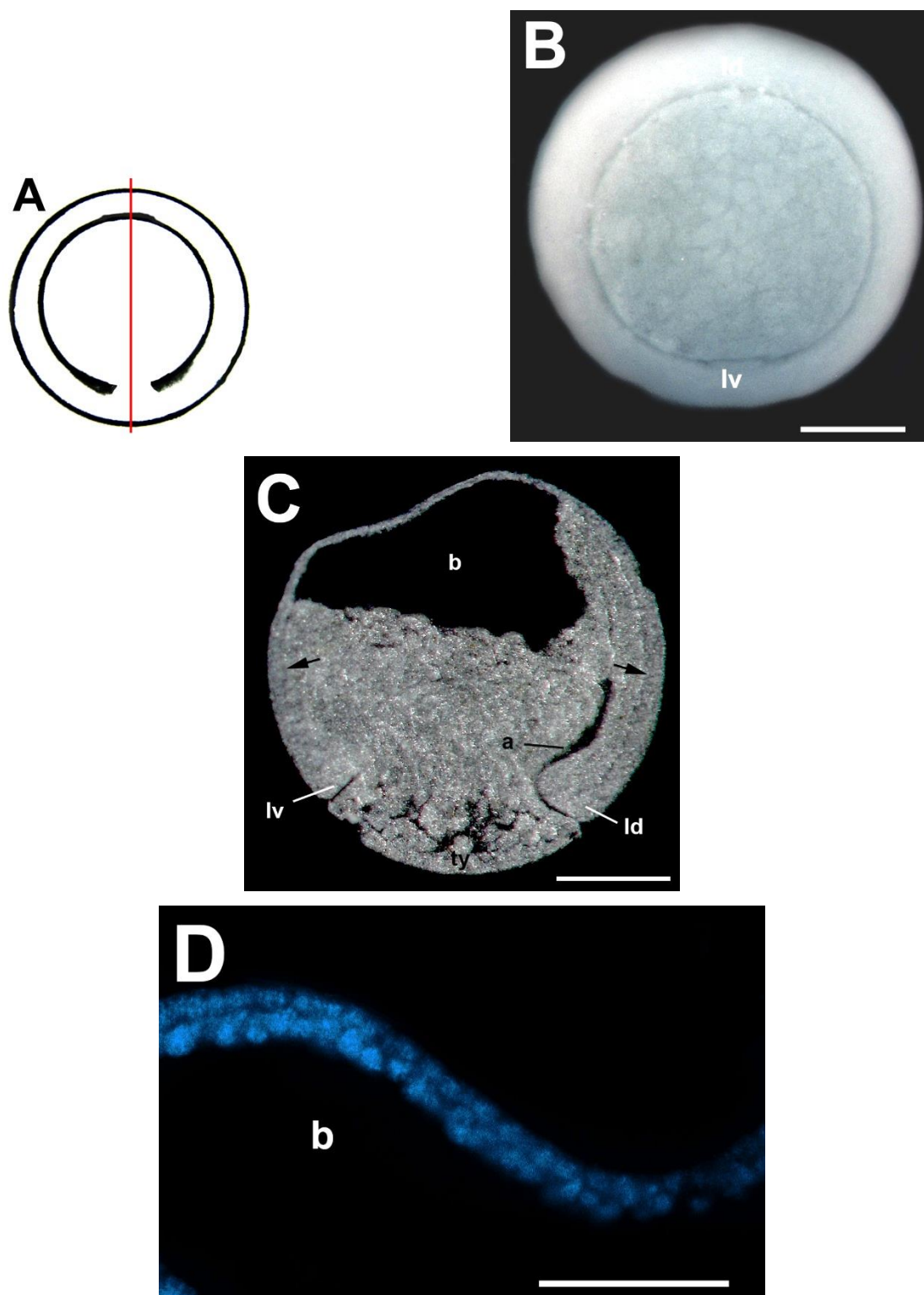
**Figura 4. Morfología del estadio de blástula de células medianas de *H. fleischmanni* (estadio 8):** (A) Blástula de células medianas. Vista lateral externa. Hemisferio animal orientado hacia arriba. La barra corresponde a 500  $\mu\text{m}$ .

Fig. 5.



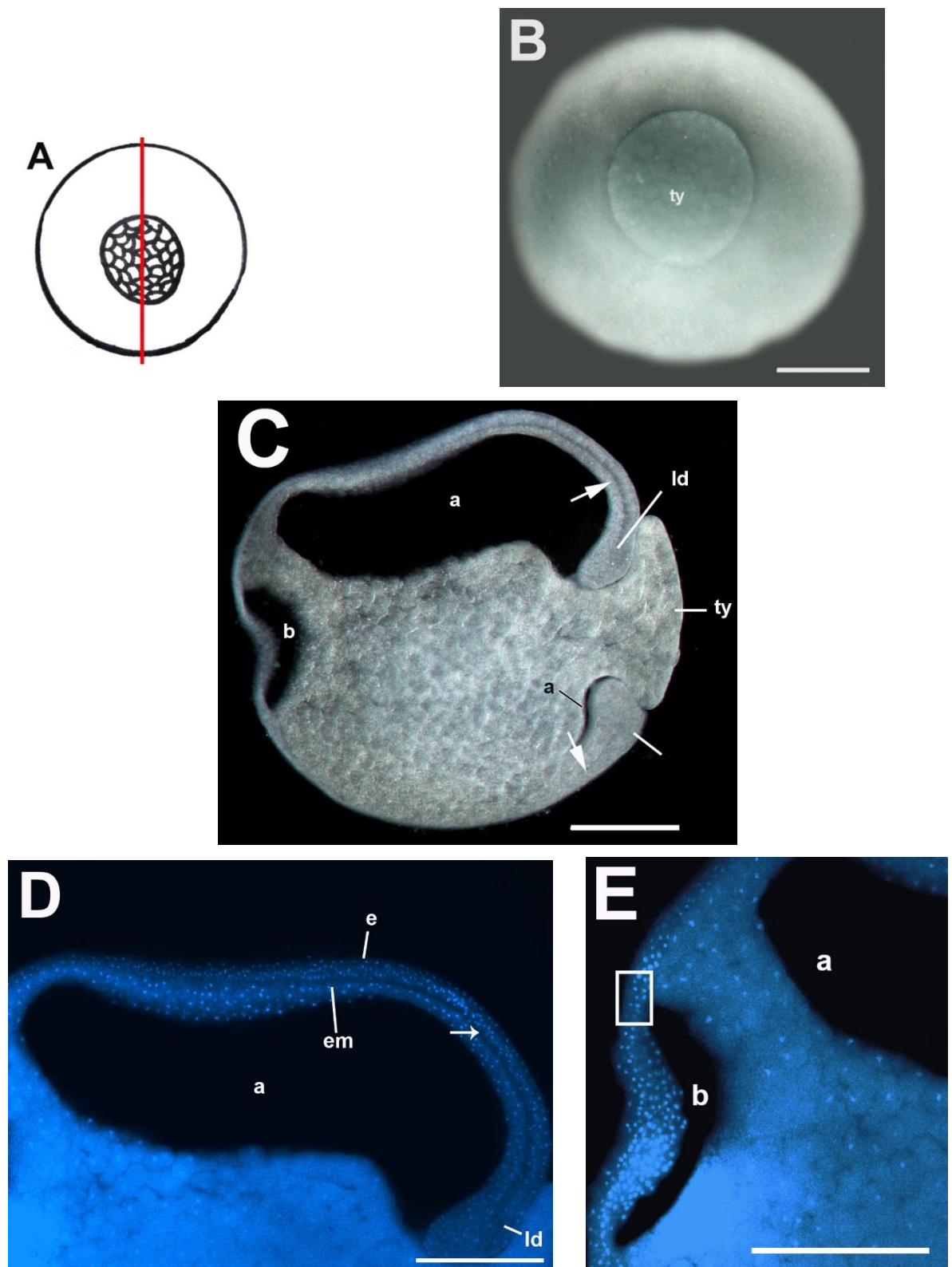
**Figura 5. Morfología de la gástrula temprana de *H. fleischmanni* (estadio 10):** A es esquema del embrión visto desde el hemisferio vegetal. Lado dorsal orientado hacia arriba. B es una vista lateral, desde el lado dorsal del embrión. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en C. (B) Gástrula temprana. Vista externa. (C) Sección sagital. El hemisferio animal orientado hacia arriba. Se observa el labio dorsal del blastoporo orientado hacia la derecha. La cavidad en el hemisferio vegetal es un artefacto de la fijación. (D) Fluorescencia nuclear de la sección en C. Acercamiento del labio dorsal del blastoporo. Se observa el arquenteron. (D) Fluorescencia nuclear de la sección en C. Acercamiento del techo del blastocele. Se observa que el techo del blastocele está formado por 3 o 4 capas de células. Las barras en B, C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en C y D corresponden a 100 $\mu\text{m}$ .

Fig. 6.



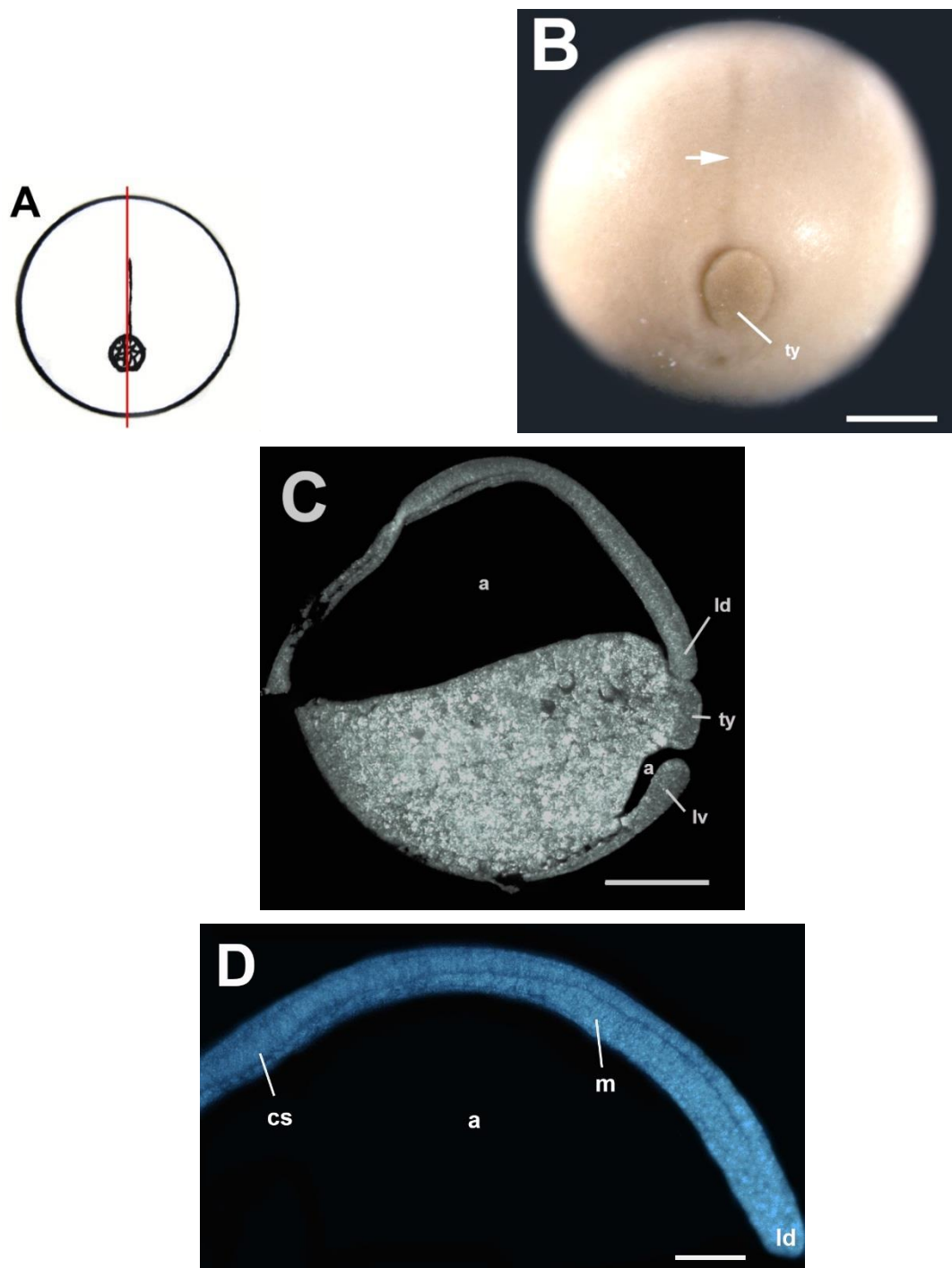
**Figura 6. Morfología de la gástrula temprana de *H. fleischmanni* (estadio 11):** A y B son vistas desde el hemisferio vegetal, con el lado dorsal orientado hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en C. (B) Gástrula temprana. Vista externa. (C) Sección sagital. El hemisferio animal está orientado hacia arriba. Se observa el labio dorsal del blastoporo a la derecha y labio ventral a la izquierda. Las flechas indican el cleft de Brachet. (D) Fluorescencia nuclear de la sección sagital en C. Acercamiento del techo del blastocele. Se observa que el techo está formado por dos capas de células. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en D corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 7.



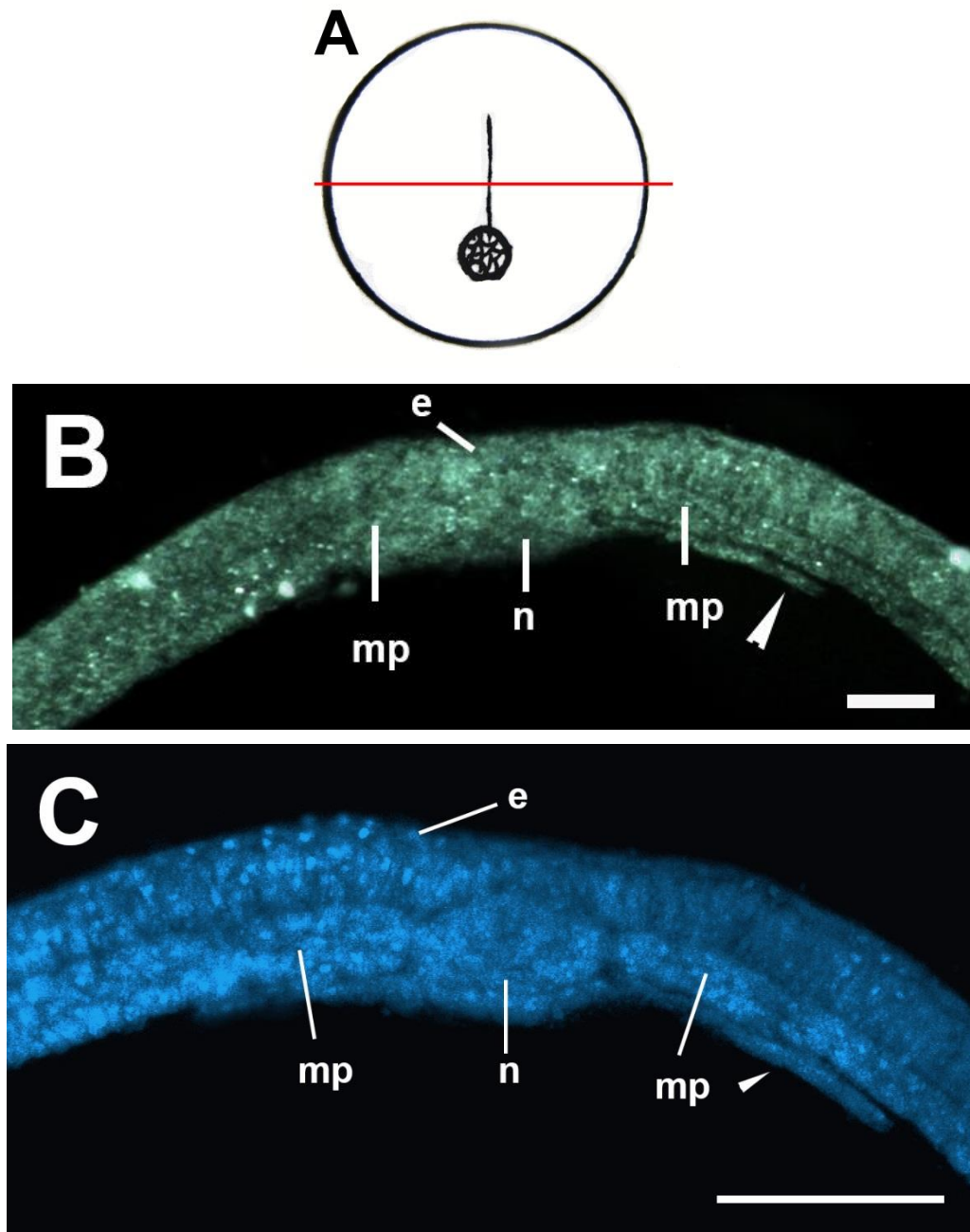
**Figura 7. Morfología de la gástrula media de *H. fleischmanni* (estadio 12):** A y B son vistas posteriores. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en C. (B) Gástrula media. Vista externa. (C) Sección sagital. Muestra la extensión del arquenterón. Las flechas señalan el cleft de Brachet. Nótese el tabique de células que separan el arquenterón del blastocele. (D) Fluorescencia nuclear de la sección en C. Acercamiento del techo del arquenterón. La flecha señala el cleft de Brachet. (E) Fluorescencia nuclear de la sección el C. Acercamiento del blastocele. Recuadro muestra que el techo del blastocele está formado por dos capas de células. El engrosamiento de una parte del techo del blastocele es producto del seccionamiento desigual de esa zona. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en D y E corresponden a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 8.



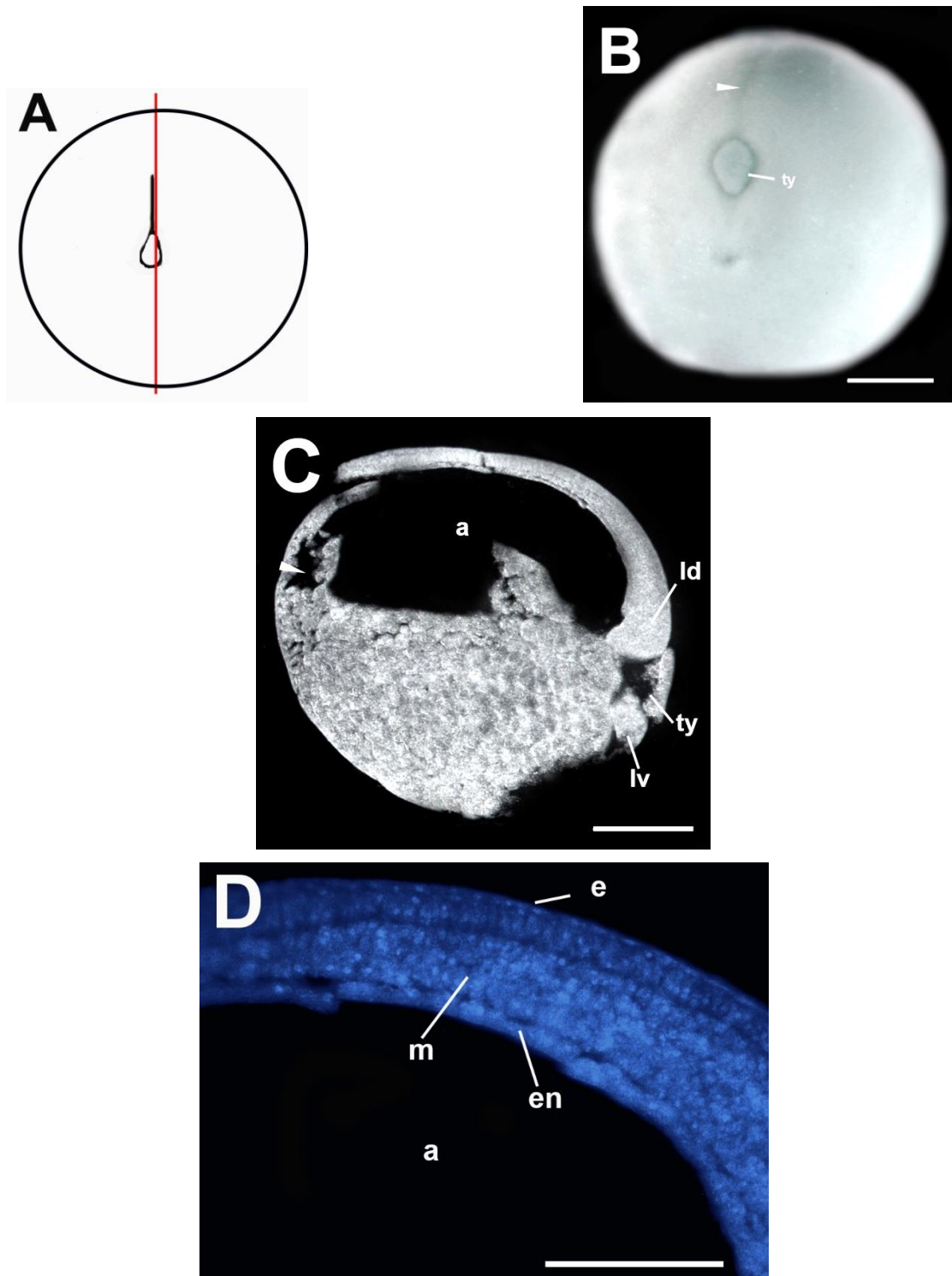
**Figura 8. Morfología de la gástrula tardía de *H. fleischmanni*. (estadio12.5):** A y B son vistas posteriores, con el lado dorsal orientado hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en C. (B) Gástrula tardía. Vista externa. La flecha indica el surco neural. (C) Sección sagital. Se observa la extensión del arquenterón. (D) Fluorescencia nuclear de una sección sagital, que muestra el techo del arquenterón. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en D corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 9.



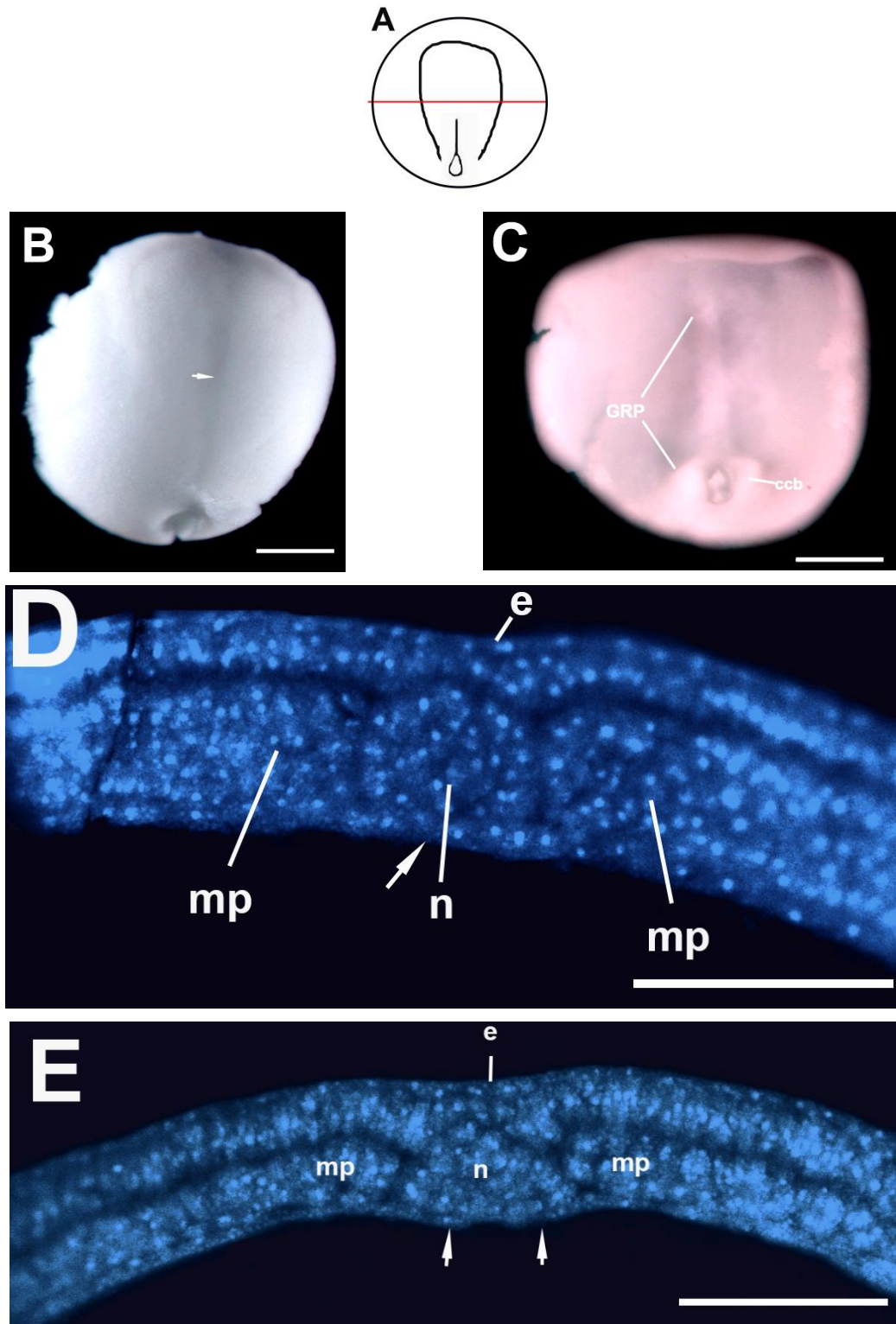
**Figura 9. Secciones transversales de embriones en estadio de gástrula tardía de *H. fleischmanni* (estadio 12.5):** A es una vista posterior, con el lado dorsal orientado hacia arriba. (A) Esquema del embrión que muestra la orientación de las secciones transversales que se muestran en B y C. (B) Sección transversal anterior. Se observa el notocordio, el ectodermo y el mesodermo paraxial. La flecha indica el recubrimiento endodermal del arquenterón. (C) Fluorescencia nuclear de la sección en B. Se observa con mayor claridad el notocordio, el mesodermo paraxial, el ectodermo de piel y el recubrimiento endodermal del arquenterón. Las barras en B y C corresponden a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 10.



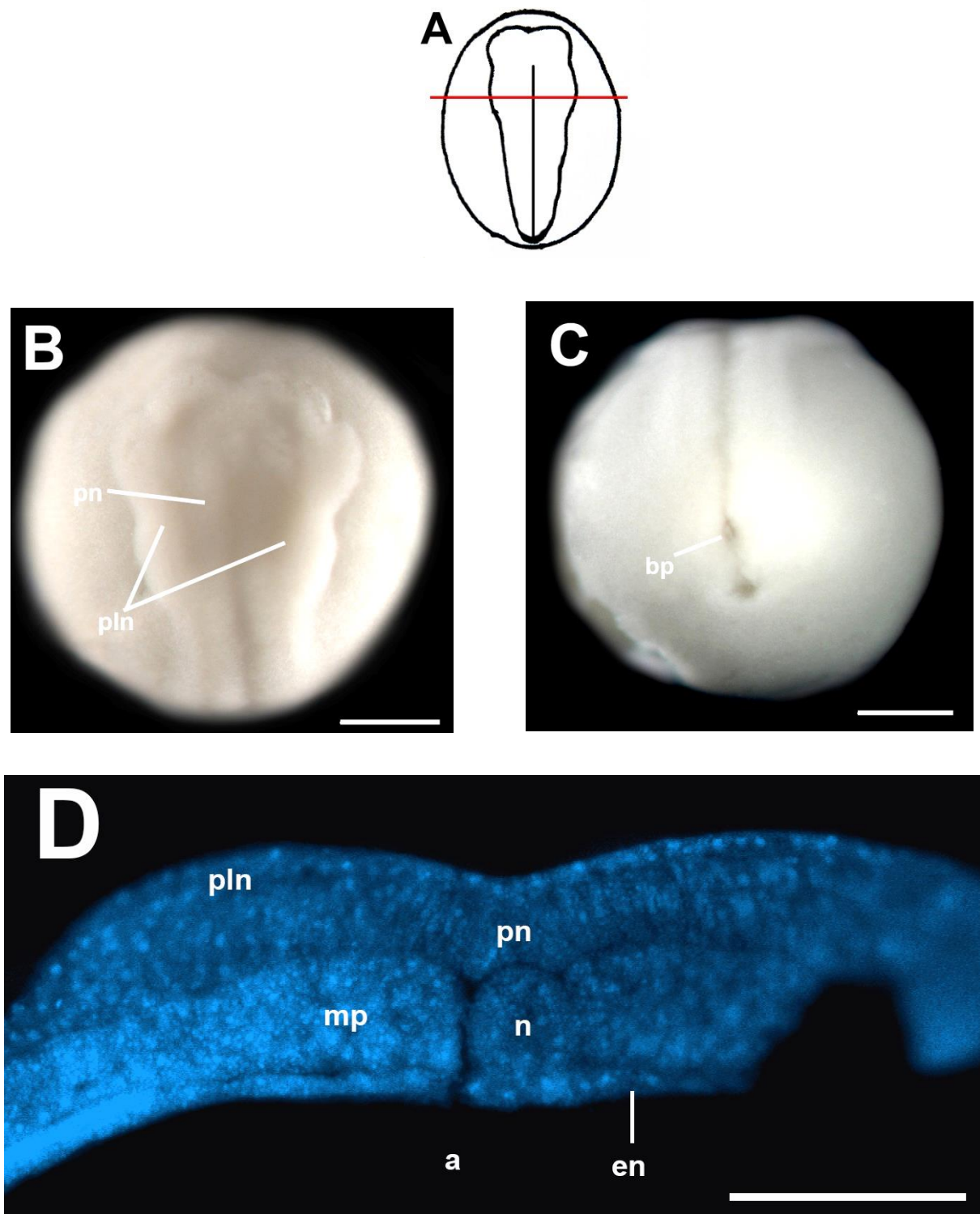
**Figura 10. Morfología de la post-gástrula de *H. fleischmanni* (estadio 13):** A y B son vistas posteriores, con el lado dorsal orientado hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en C. (B) Gástrula tardía. Vista externa de un embrión que aún conserva el tapón de yema. La flecha señala el surco neural. (C) Sección sagital. La flecha indica el remanente de blastocele. Se observa el tamaño reducido del tapón de yema. (D) Fluorescencia nuclear de la sección en C. Acercamiento del techo del arquenterón. Se observan el ectodermo, el mesodermo y el recubrimiento endodermal del arquenterón. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en D corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 11.



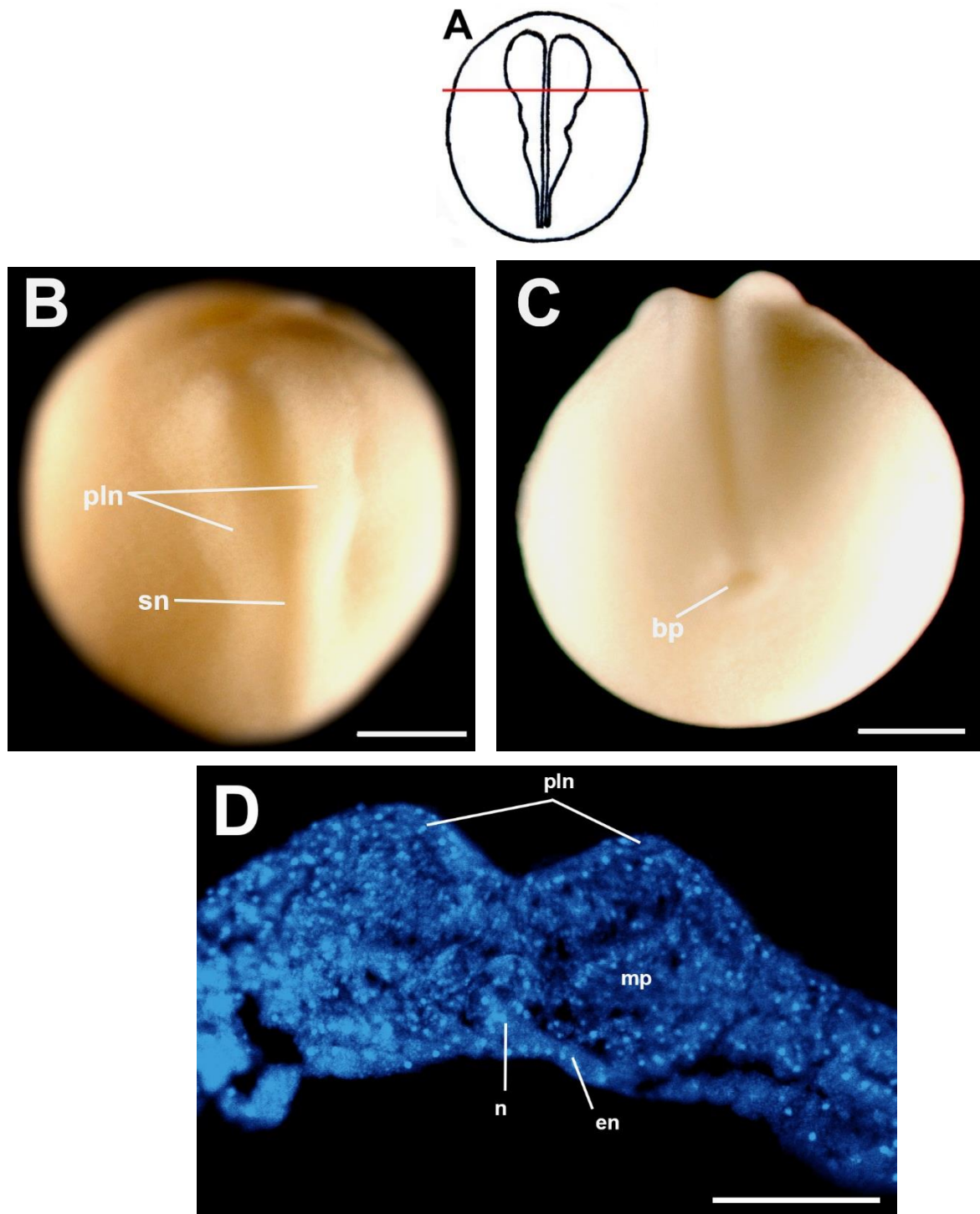
**Figura 11. Morfología del estadio de post-gástrula de *H. fleischmanni* en vistas externa e interna estadio 13):** A y B son vistas dorsales con el lado rostral orientado hacia arriba. (A) Orientación de las secciones transversales que se muestran en D y E. (B) Placa neural. Vista externa. La flecha indica el surco neural. (C) Vista interna del techo del arquenterón. El lado rostral está orientado hacia arriba (Foto: Natalia Sáenz). Se observa en la parte posterior del arquenterón, el GRP y el collar circumblastoporal. (D) Fluorescencia nuclear de una sección transversal a través de la región rostral de la gástrula tardía. Se observa el ectodermo, el notocordio y el mesodermo paraxial. La flecha indica el recubrimiento endodermal. (E) Fluorescencia nuclear de una sección transversal a través de la región caudal de la gástrula tardía. Se observa el ectodermo, el notocordio y el mesodermo paraxial. Las flechas indican las crestas endodermales laterales. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en D y E corresponden 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 12.



**Figura 12. Morfología de la néurula temprana de *H. fleischmanni* (estadio 14):** La región rostral en A y B está orientada hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección transversal que se muestra en D. (B) Néurula temprana. Vista externa de la región anterior. Se observan los pliegues neurales y la placa neural. (C) Néurula temprana. Vista externa de la región posterior del embrión en B. Se observa el blastoporo. (D) Fluorescencia nuclear de una sección transversal de los pliegues neurales y el notocordio. Se observa la placa neural, el notocordio, el mesodermo paraxial y el endodermo. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en D a 100  $\mu\text{m}$ .

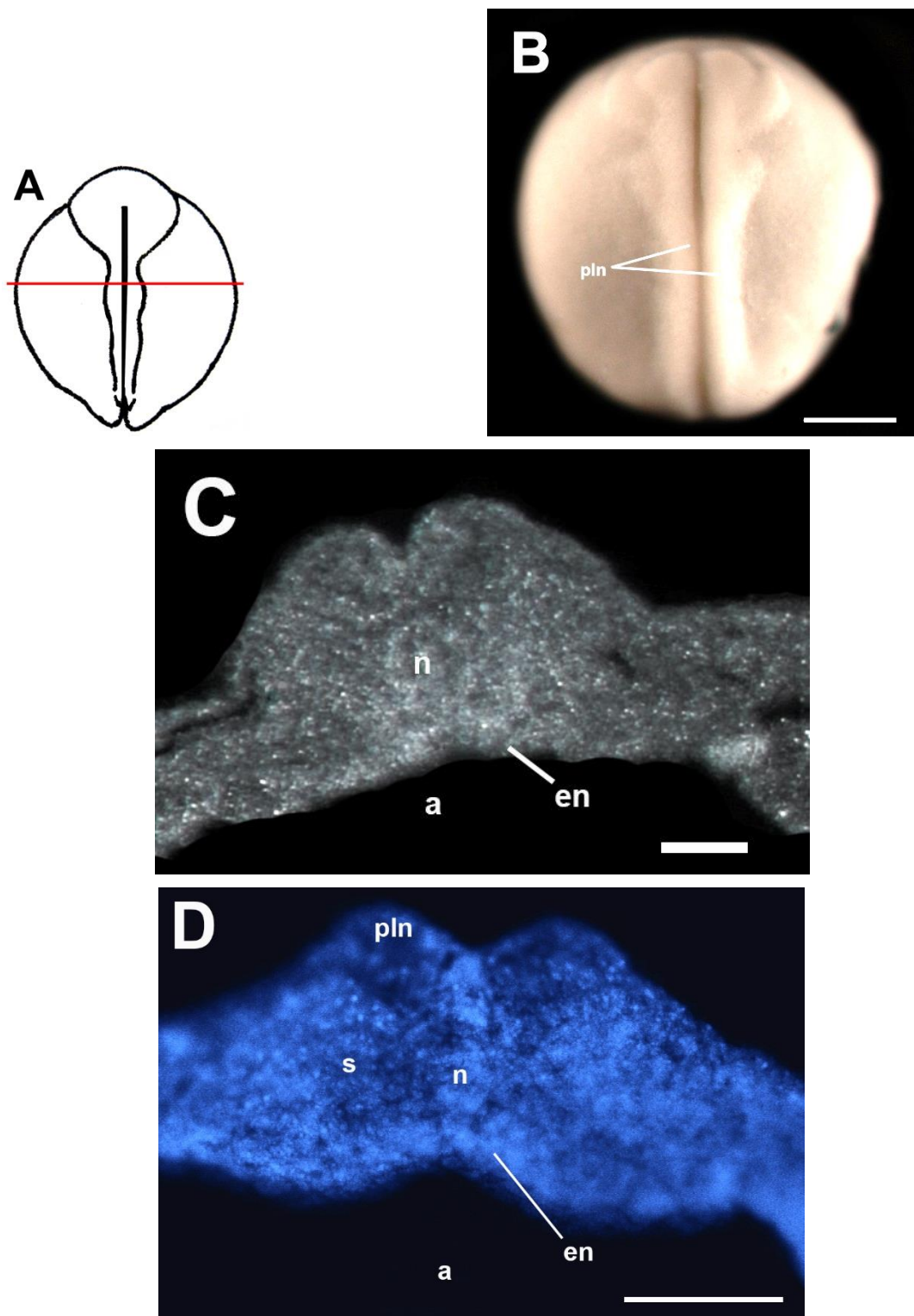
Fig. 13.



**Figura 13. Morfología de la néurula media de *H. fleischmanni* (estadio 15):** La región rostral en A y B está orientada hacia arriba. C es una vista posterior del embrión en B.

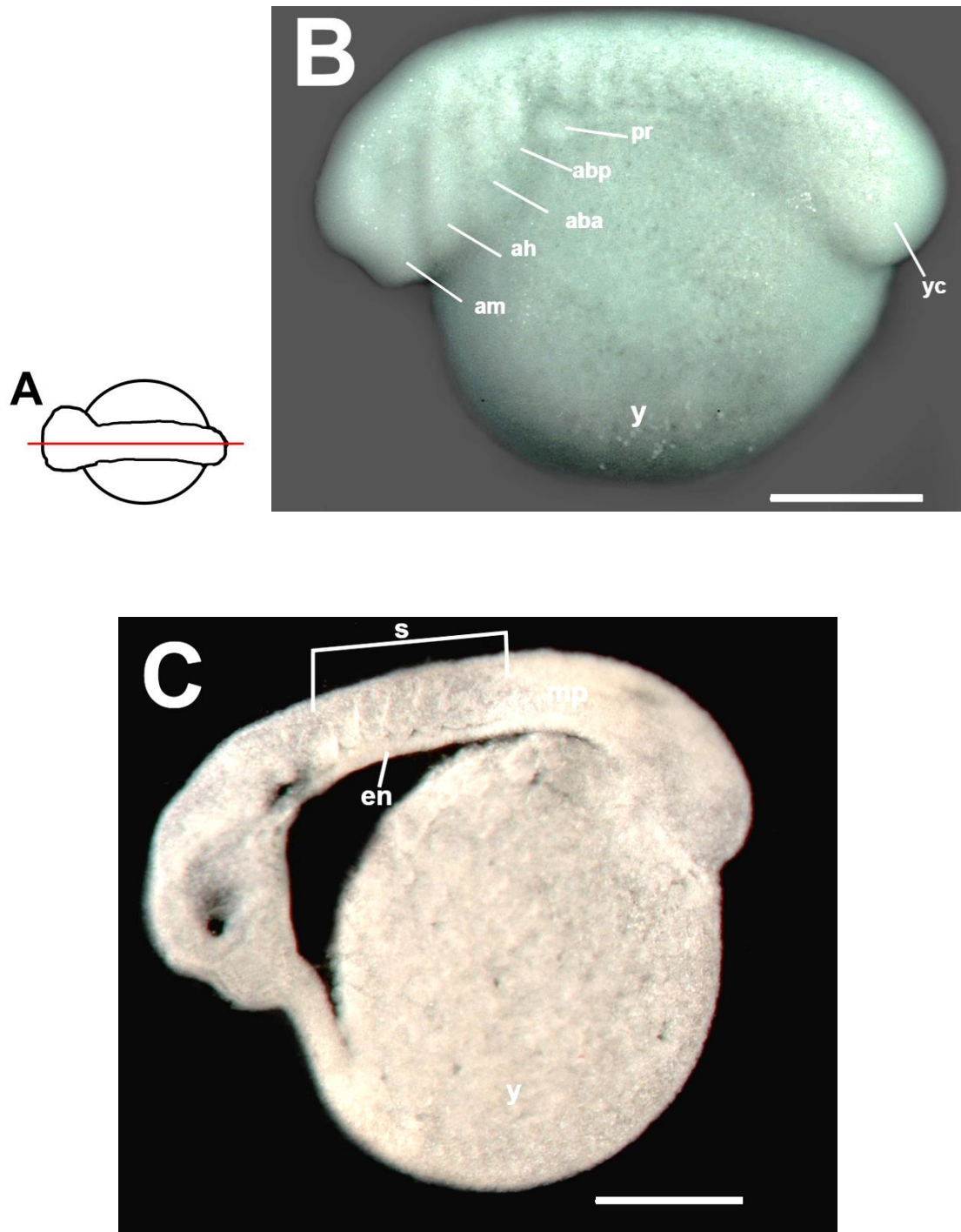
(A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección transversal que se muestra en D. (B) Néurula media. Vista externa de la región anterior. Se observan los pliegues neurales, el surco neural. (C) Vista externa de la región posterior del embrión en B. Se observa el blastoporo. (D) Fluorescencia nuclear de una sección transversal. Se observa el notocordio, los pliegues neurales, el mesodermo paraxial. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en D corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 14.



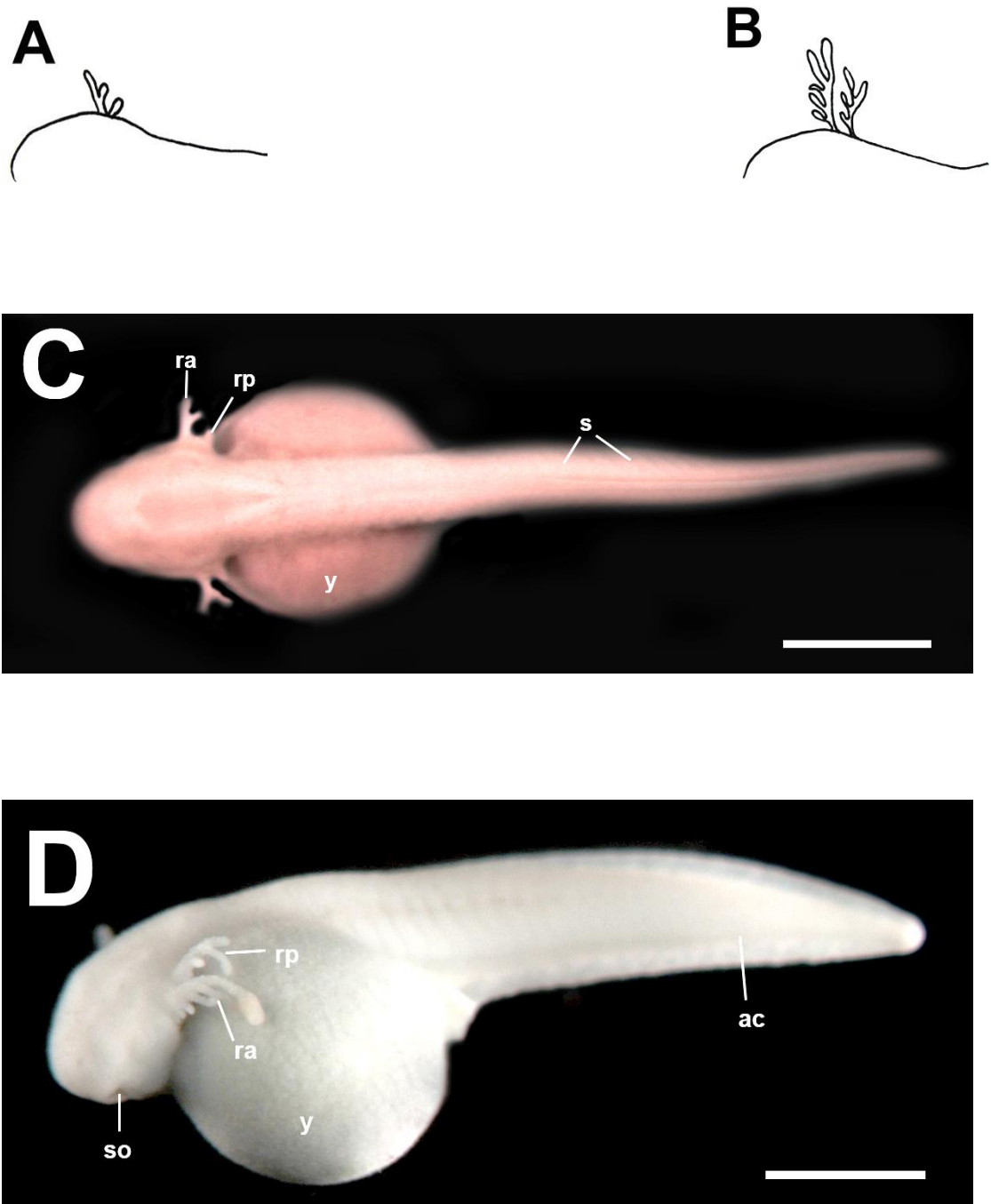
**Figura 14. Morfología de la néurula tardía de *H. fleischmanni* (estadio 16):** La región rostral en A y B está orientada hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de las secciones transversales que se muestran en C y D. (B) Néurula tardía. Vista externa. Se observan los pliegues neurales. (C) Sección transversal a través de los pliegues neurales y el notocordio. Se observan los pliegues neurales antes de fusionarse, el notocordio y el recubrimiento endodermal del arquenterón. (D) Fluorescencia nuclear de otra sección transversal en la región del tronco. Se observa con mayor claridad el notocordio, los somitas y el recubrimiento endodermal del arquenterón. La barra en B corresponde a 500  $\mu\text{m}$  y en C y D corresponden a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 15.



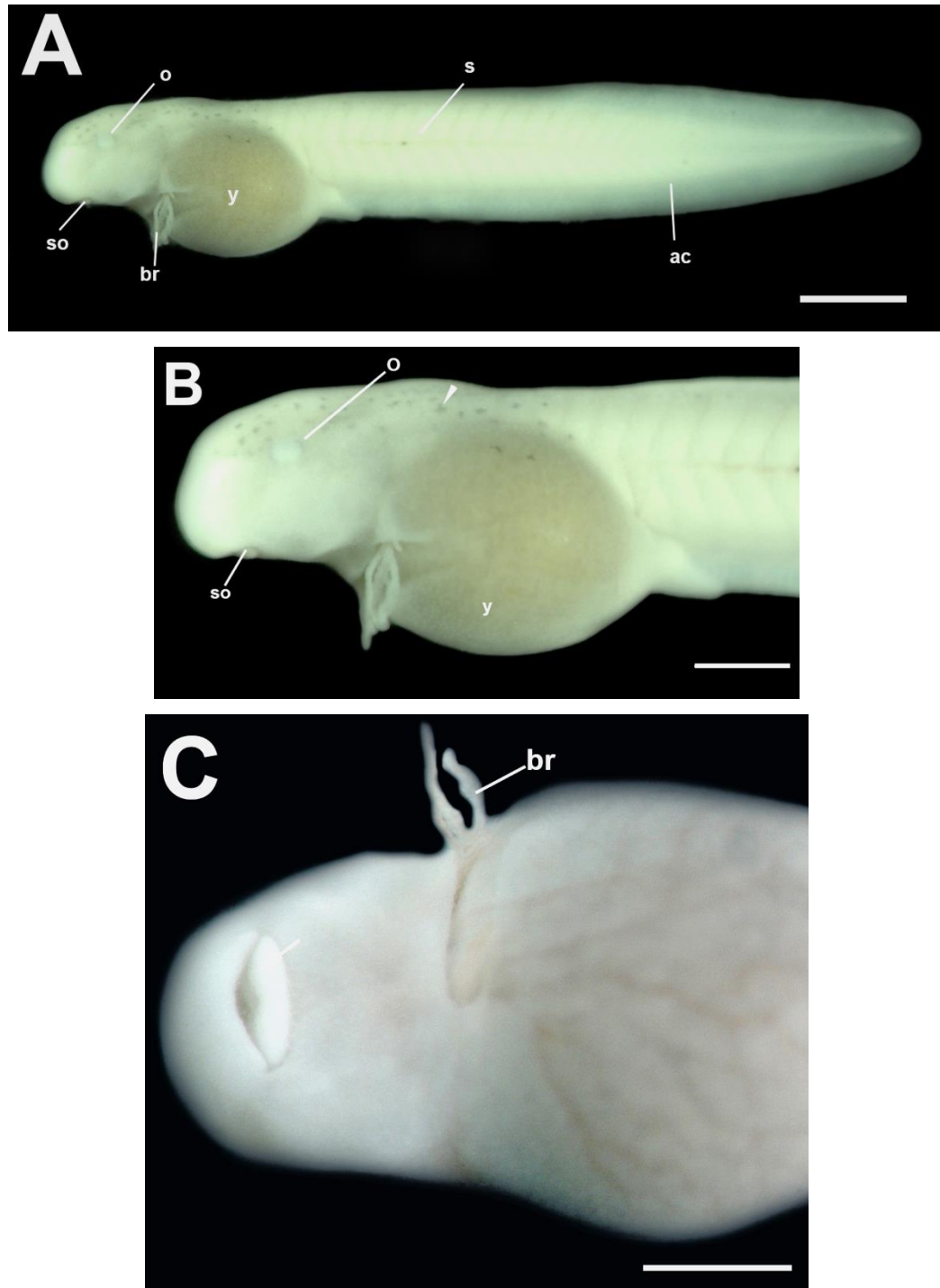
**Figura 15. Morfología del estadio de yema de la cola de *H. fleischmanni* (estadio 17):** En A, B, C la región rostral está orientada hacia la izquierda. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que muestra en C. (B) Embrión entero en el estadio de yema de la cola. Se observan los arcos branquiales, los pronefros y la yema de la cola (Foto: Natalia Sáenz). (C) Sección sagital. Se observan los somitas y el mesodermo paraxial. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$ .

Fig. 16.



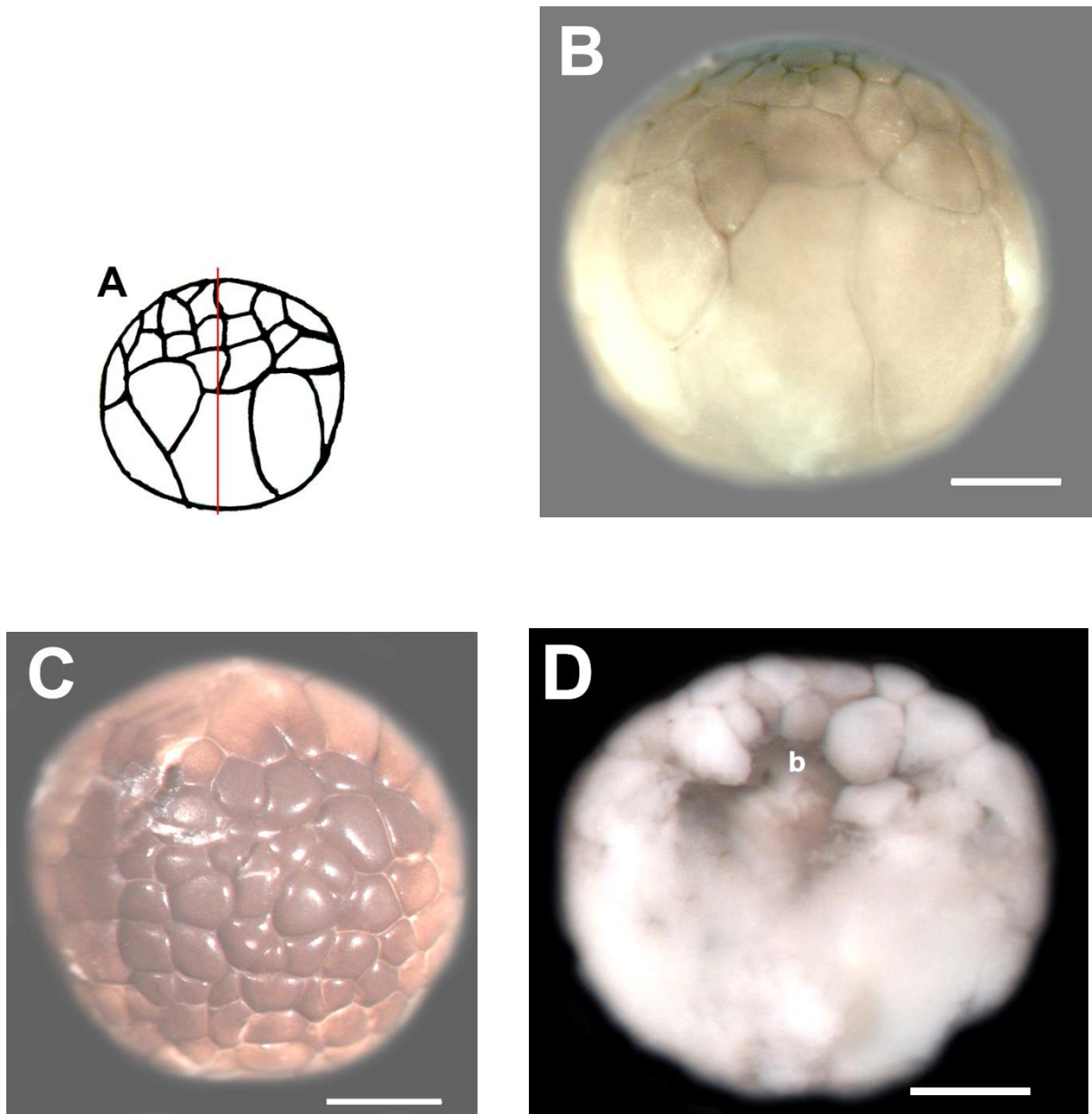
**Figura 16. Morfología del estadio de desarrollo de las branquias y del estadio de desarrollo completo de las branquias de *H. fleischmanni* (estadio 21 y 23):** La región rostral en A, B, C y D está orientada hacia la izquierda. C es una vista dorsal. D es un vista lateral. (A) Esquema de las branquias de un embrión en estadio 21. Se observan las ramas de las branquias. La rama anterior posee 2 ramificaciones. La rama posterior sin ramificaciones. (B) Esquema de las branquias de un embrión en estadio 23. Se observan las ramas de las branquias en su máxima extensión. La rama anterior posee 5 ramificaciones y la rama posterior presenta 4 ramificaciones. (C) Embrión entero en estadio de desarrollo de las branquias. Se observan la rama anterior y posterior de las branquias (Foto: Natalia Sáenz). (D) Embrión entero en estadio de desarrollo completo de las branquias. Se observan las ramas de las branquias tanto anterior como posterior con sus ramificaciones. Las barras en C y D corresponden a 1mm.

Fig. 17.



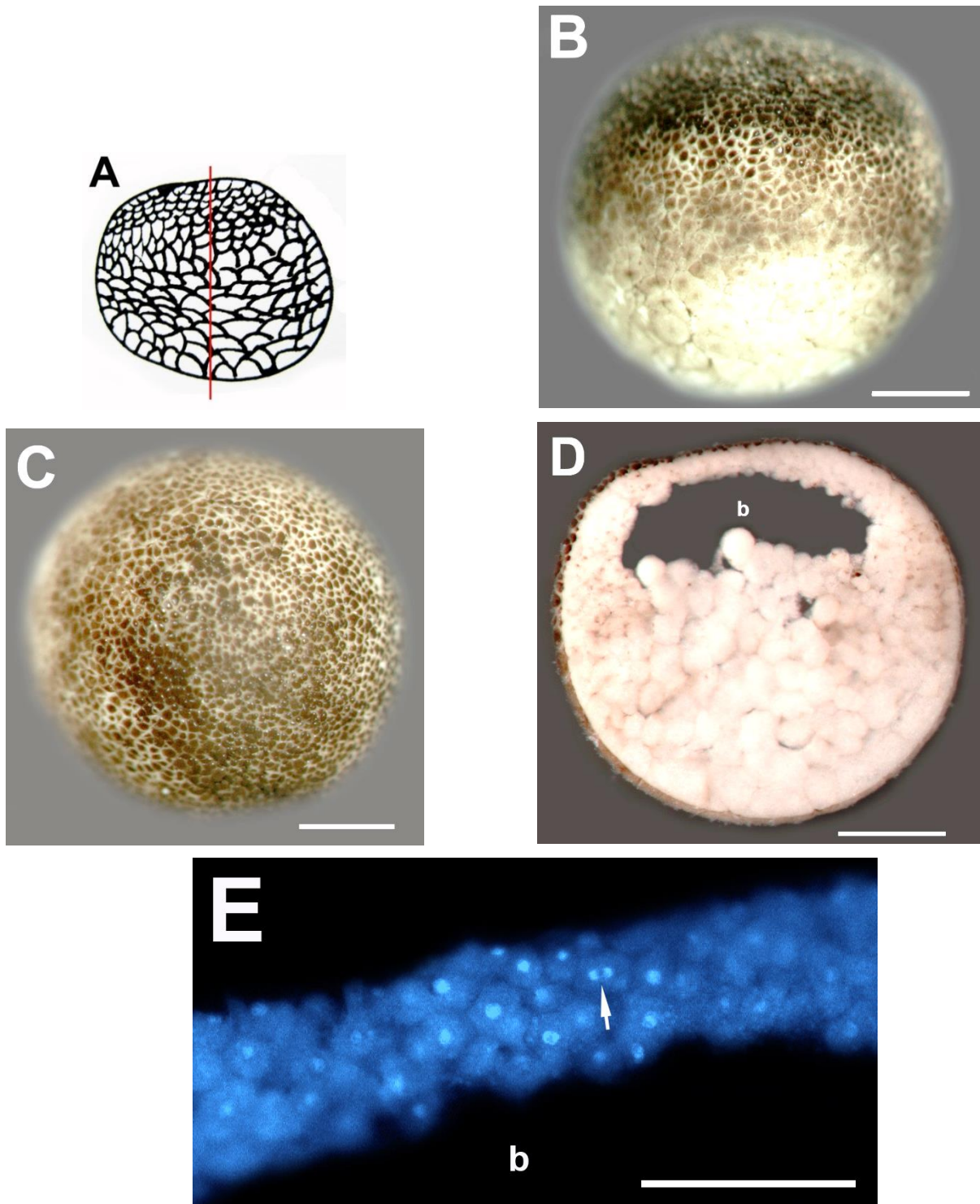
**Figura 17. Morfología de los embriones a la eclosión de *H. fleischmanni* (estadio 25):** La región rostral en A, B y C está orientada hacia la izquierda. (A) Vista lateral de un embrión a la eclosión. Se observa la aleta caudal, los somitas y las branquias. (B) Acercamiento de la región rostral del embrión en A. La flecha indica el pigmento que posee el embrión en la región dorsal de la cabeza. (C) Vista ventral de la cabeza. Se observa branquias de tamaño reducido solo a un lado del embrión. La flecha indica el disco oral. La barra en A corresponde a 1mm y en B y C corresponde a 500  $\mu\text{m}$ .

Fig. 18.



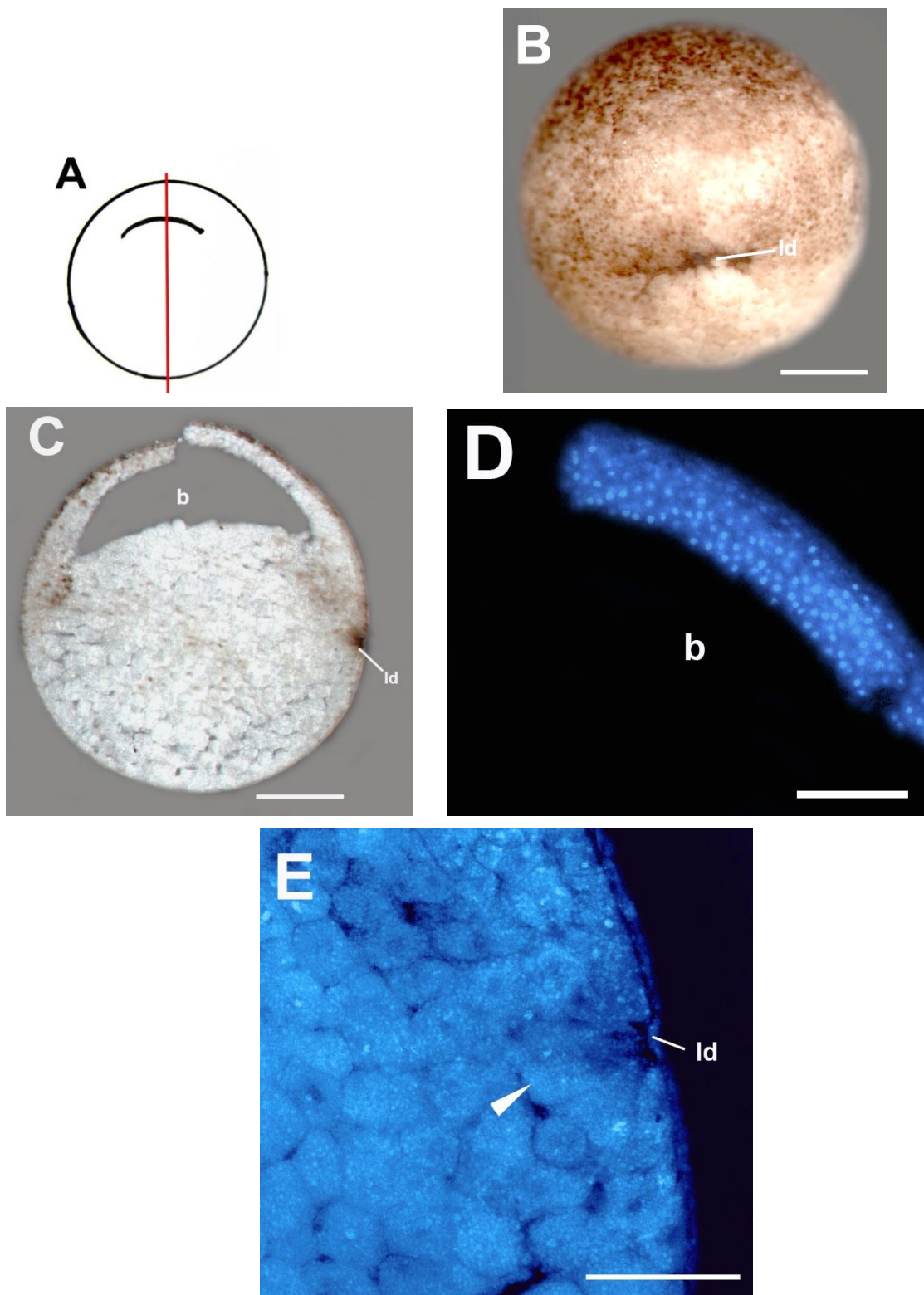
**Figura 18. Morfología del estadio de 32 células *E. callistomma* (estadio 6):** A y B son vistas laterales. Hemisferio animal orientado hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la bisección sagital que se muestra en C. (B) Embrión de 32 células. Vista externa. (C) Vista del hemisferio animal. (D) Bisección sagital, con el hemisferio animal orientado hacia arriba. Se observa el blastocele como una pequeña cavidad. Las barras en B, C y D corresponden a 500  $\mu\text{m}$ .

Fig. 19.



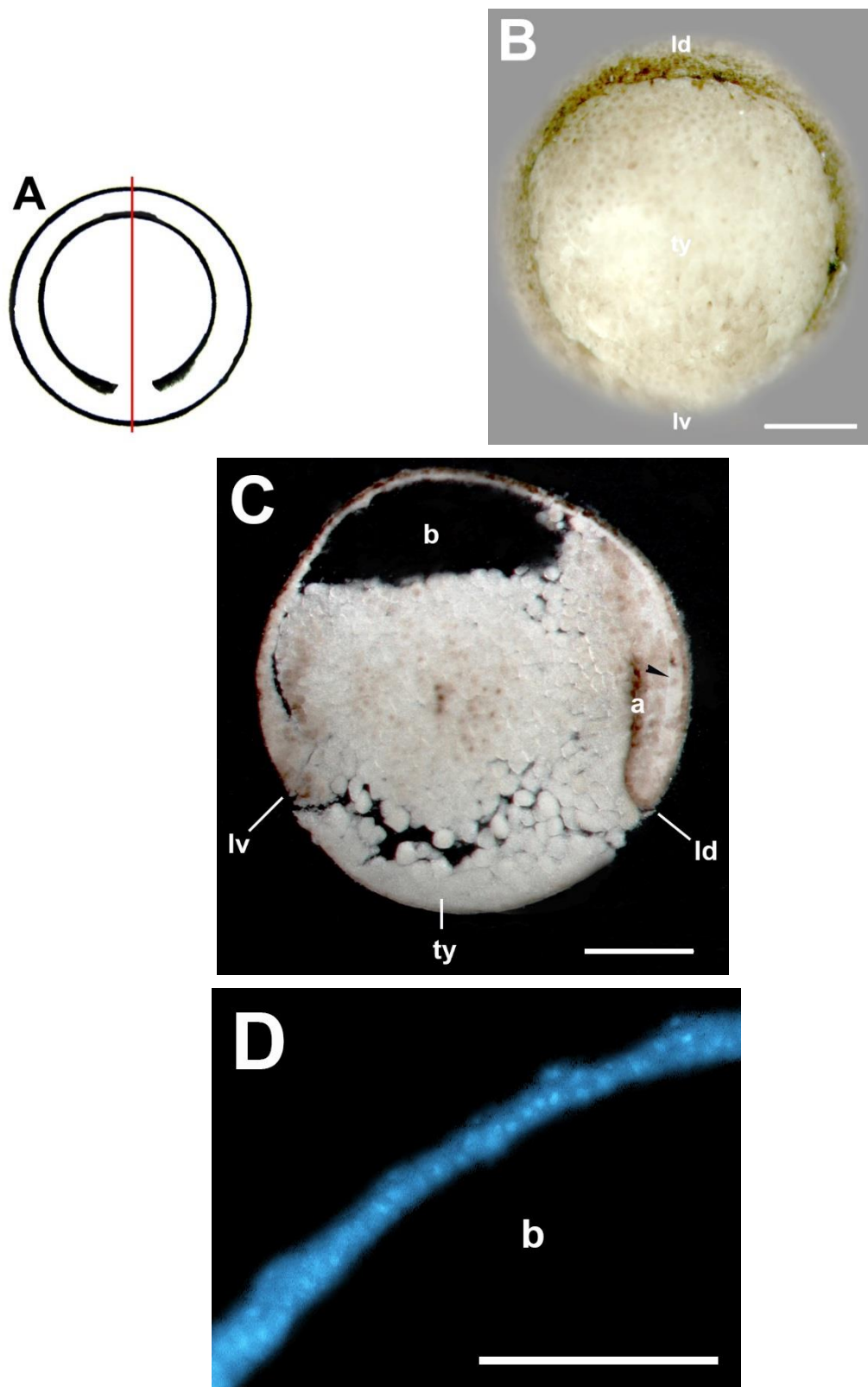
**Figura 19. Morfología de la blástula de células medianas *E. callistomma* (estadio 8):** A y B son vistas laterales. Hemisferio animal orientado hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en D. (B) Blástula de células medianas. (C) Vista del hemisferio animal. (D) Sección sagital. Se observa la extensión del blastocele. (E) Fluorescencia nuclear de la sección en D. Acercamiento del techo del blastocele. Se observa que el techo está formado por 4 a 5 capas de células. La flecha indica un núcleo de una célula en proceso de división. Las barras en B, C y D corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en E corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 20.



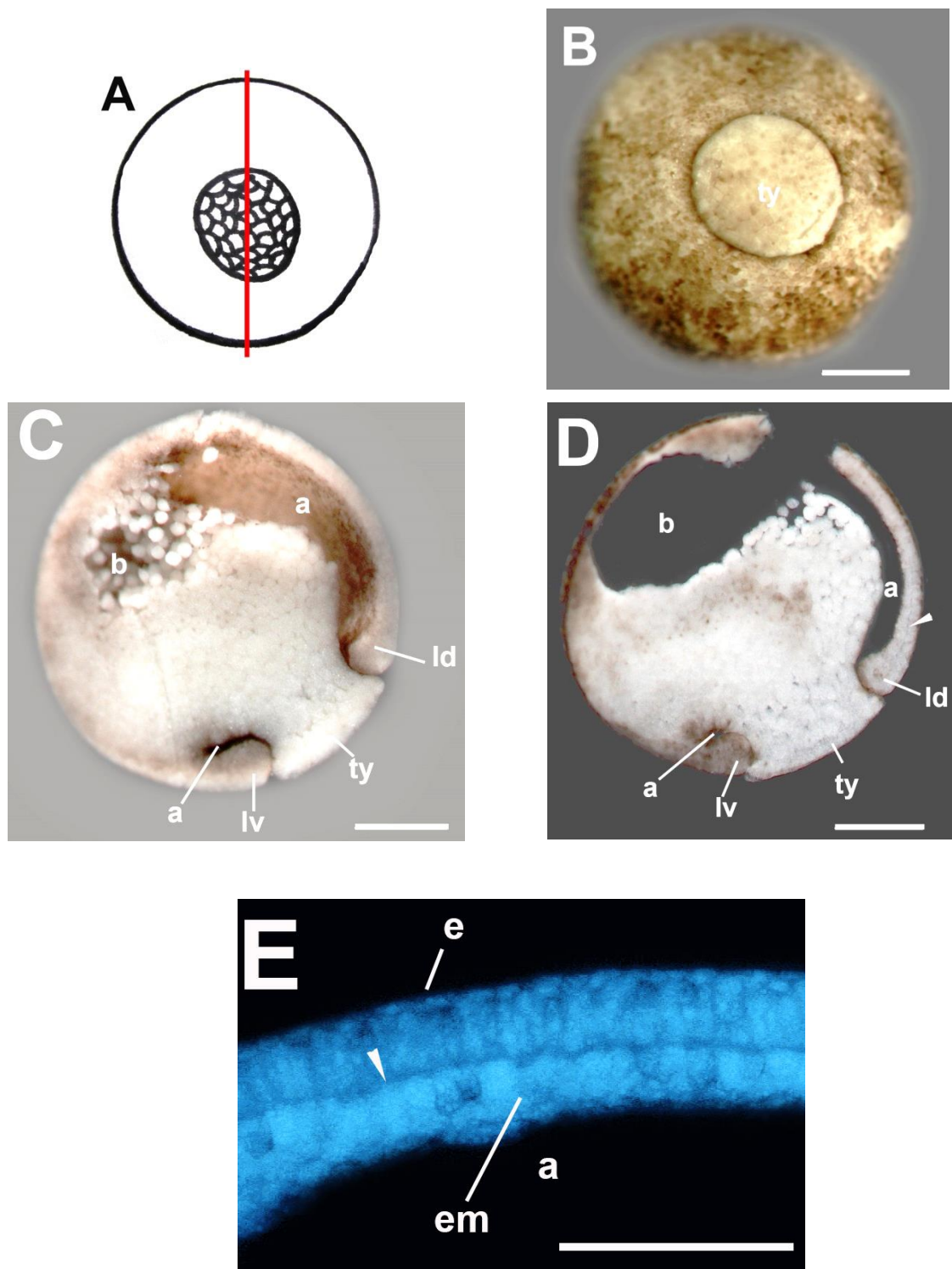
**Figura 20. Morfología de la gástrula temprana de *E. callistomma* (estadio 10):** A es una vista desde el hemisferio vegetal. Lado dorsal orientado hacia arriba. B es una vista lateral, desde el lado dorsal del embrión. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en C. (B) Gástrula temprana. Vista externa. Se observa la hendidura del labio dorsal del blastoporo. (C) Sección sagital. Hemisferio animal orientado hacia arriba. Se observa el labio dorsal del blastoporo orientado hacia la derecha. (D) Fluorescencia nuclear de la sección sagital en C. Acercamiento del techo del blastocele. Se observa que el techo está formado por una capa de 6 o 7 células. (E) Fluorescencia nuclear de la sección en C. Acercamiento del labio dorsal del blastoporo. La flecha señala una célula de botella. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en D y E corresponden a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 21.



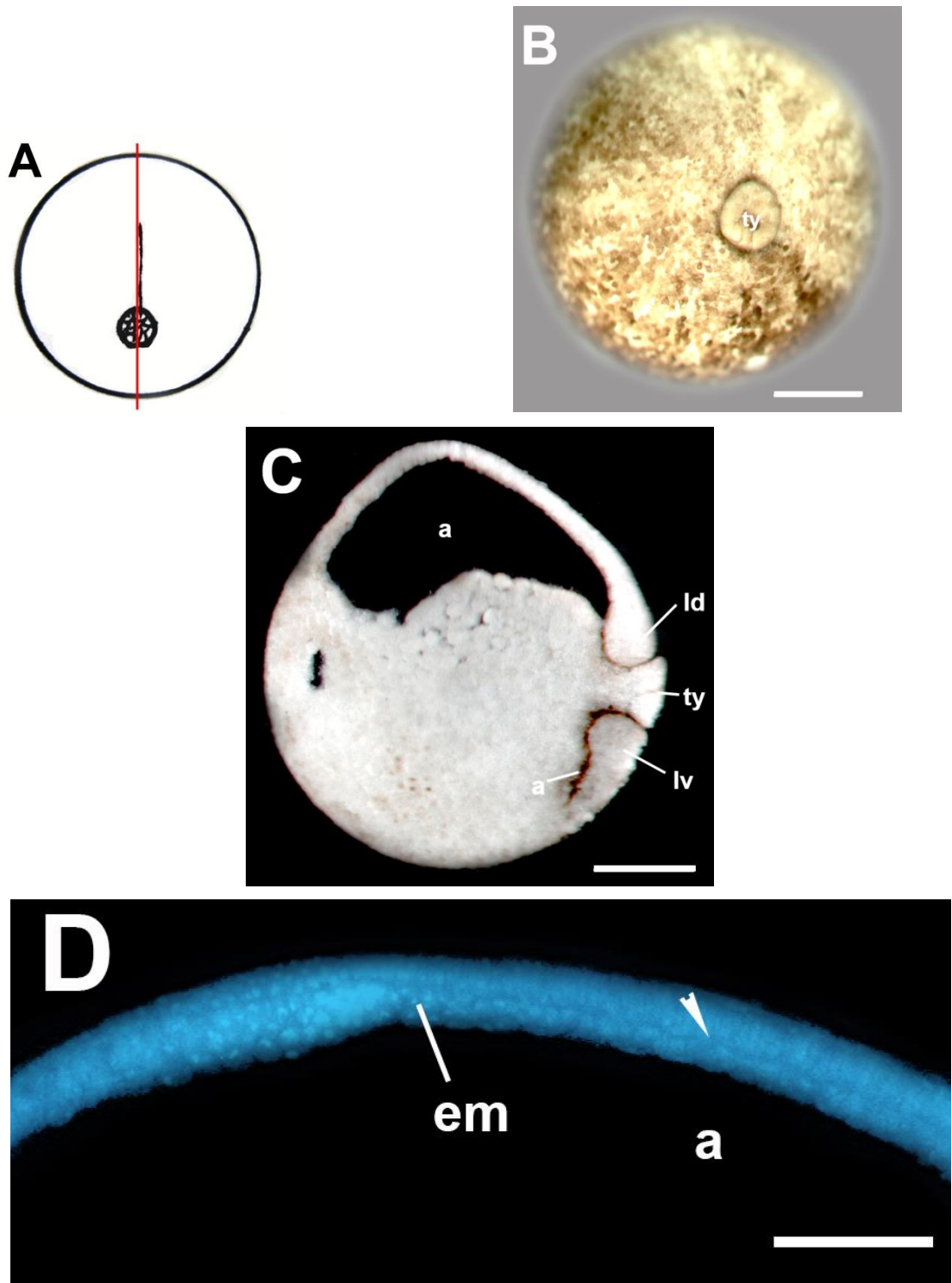
**Figura 21. Morfología de la gástrula temprana de *E. callistomma* (estadio 11):** A y B son vistas desde en hemisferio vegetal. Lado dorsal orientado hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en C. (B) Gástrula temprana. Vista externa. (C) Sección sagital. El hemisferio animal está orientado hacia arriba. Se observa el labio dorsal del blastoporo a la derecha y el labio ventral a la izquierda. La flecha indica el cleft de Brachet. (D) Fluorescencia nuclear de la sección sagital en C. Acercamiento del techo del blastocele. Se observa que el techo está formado por 2 capas de células. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en D corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 22.



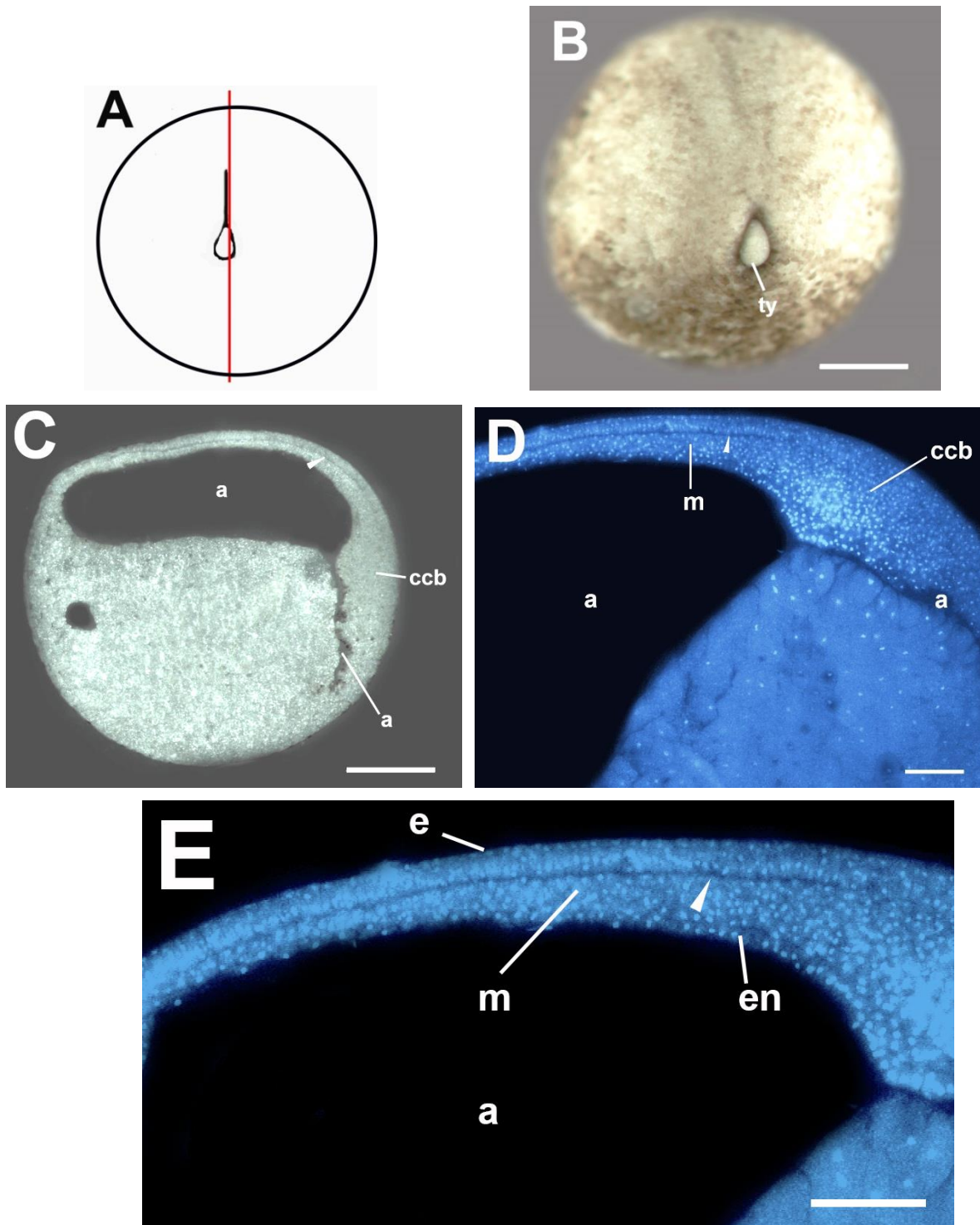
**Figura 22. Morfología de la gástrula media de *E. callistomma* (estadio 12):** A y B son vistas posteriores. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección bisección sagital que se muestra en C y de la sección sagital en D. (B) Gástrula media. Vista externa. (C) Bisección sagital. Se observa el progreso de la expansión del arquenterón. La reducción del tamaño del blastocele. (D) Sección sagital. Se observa el arquenterón y el blastocele como una sola cavidad, esto es producto del seccionamiento. (E) Fluorescencia nuclear de la sección sagital en D. Acercamiento del techo del arquenterón. La flecha indica el cleft de Brachet. Las barras en B, C y D corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en E corresponden a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 23.



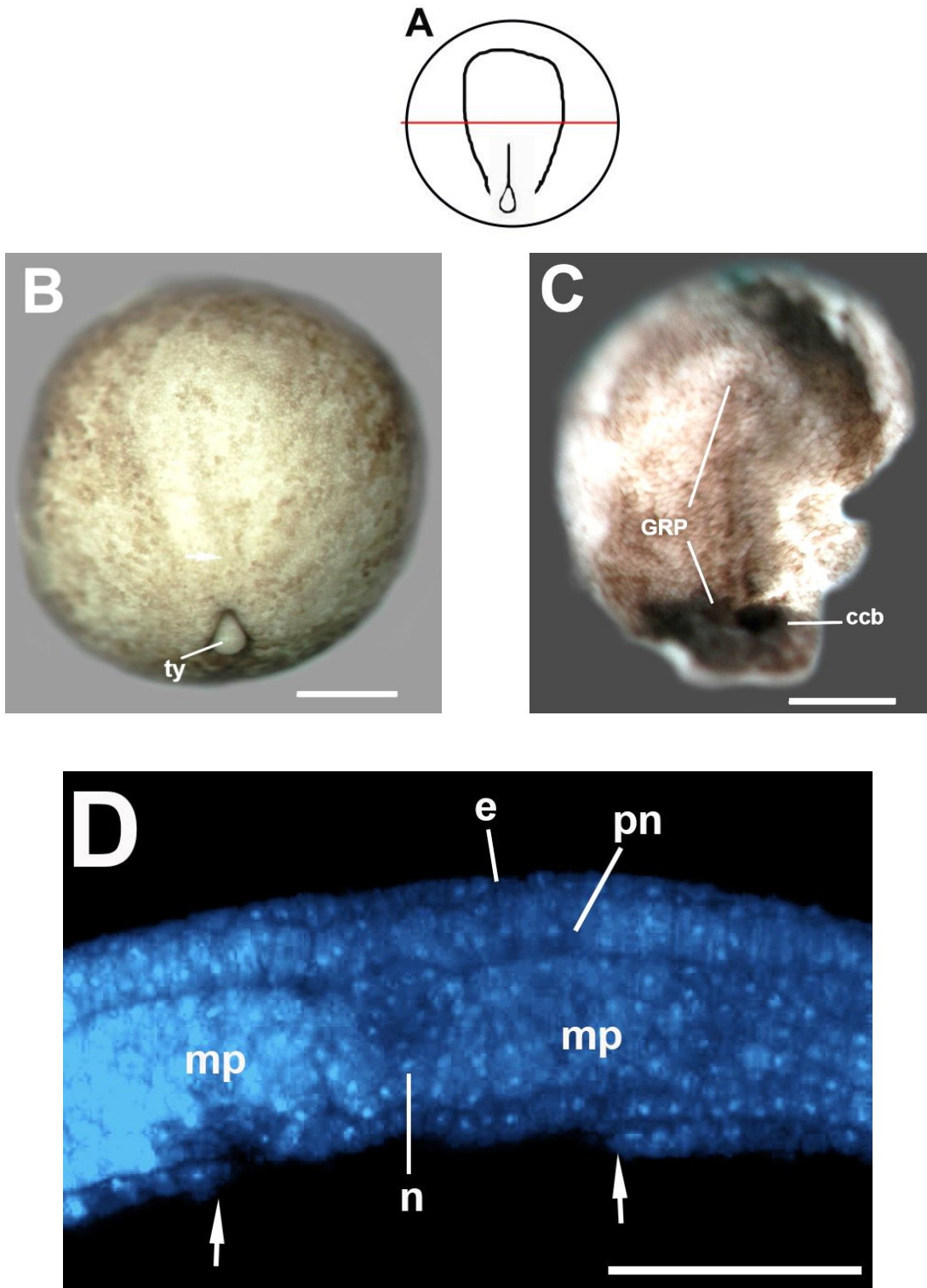
**Figura 23. Morfología de la gástrula tardía de *E. callistomma* (estadio 12.5):** A y B son vistas posteriores. Lado dorsal orientado hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital que se muestra en C. (B) Gástrula tardía. Vista externa. (C) Sección sagital. Se observa la extensión del arquenterón. (D) Fluorescencia nuclear de una sección sagital, que muestra el techo del arquenterón. La flecha indica el cleft de Brachet. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en D corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 24.



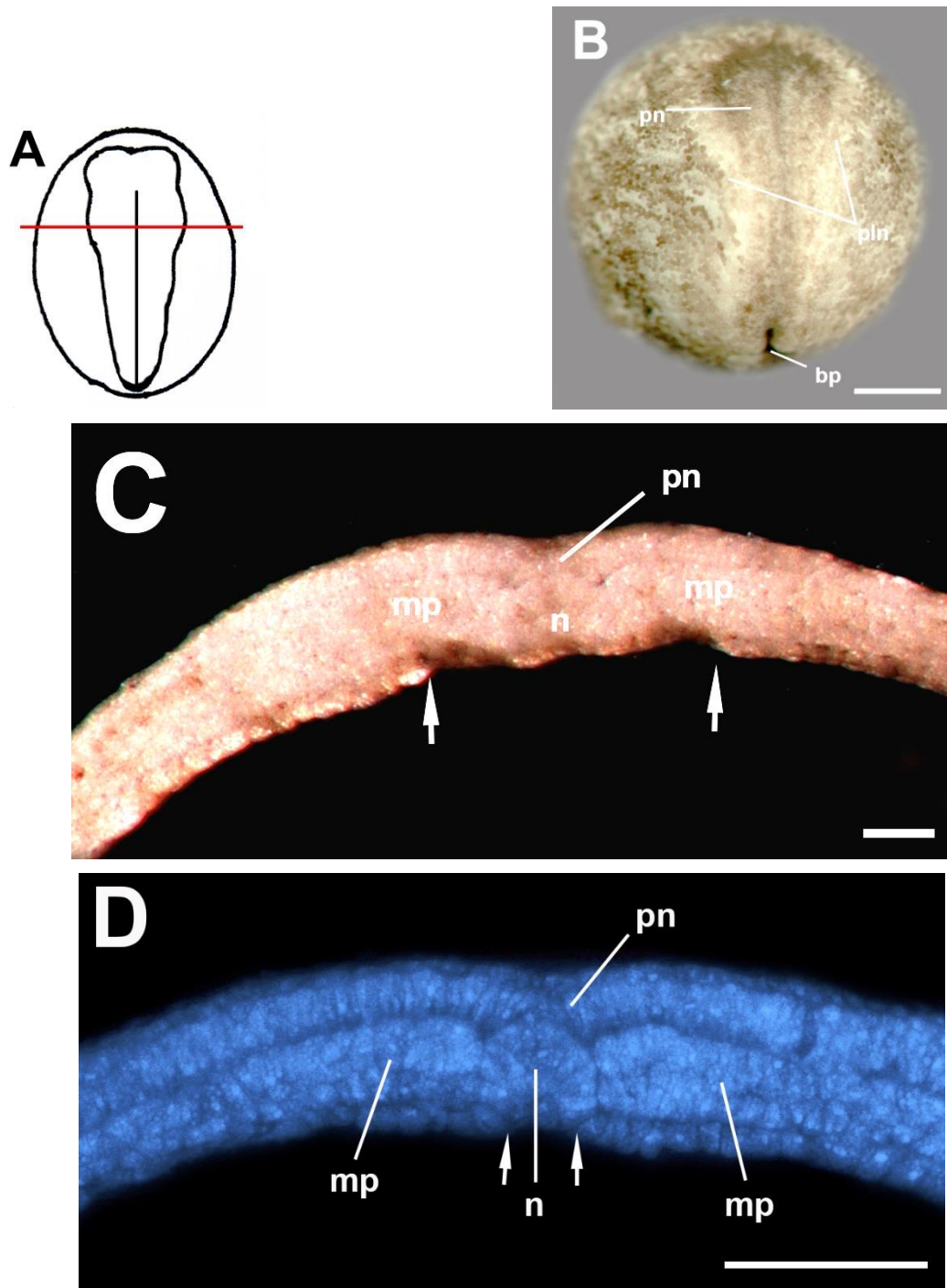
**Figura 24. Morfología de la post-gástrula de *E. callistomma* (estadio 13):** A y B son vistas posteriores. Lado dorsal orientado hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección parasagital que se muestra en C. (B) Post-gástrula. Vista externa de un embrión que aún conserva el tapón de yema. (C) Sección parasagital. Se observa la extensión del arquenterón. (D) Fluorescencia nuclear de la sección parasagital en C. Se observa el collar circumblastoporal. La flecha indica el cleft de Brachet. (E) Fluorescencia nuclear de otra sección parasagital. Acercamiento del techo del arquenterón. Se observa el ectodermo, el mesodermo y el recubrimiento endodermal del arquenterón. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en D y E corresponden a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 25.



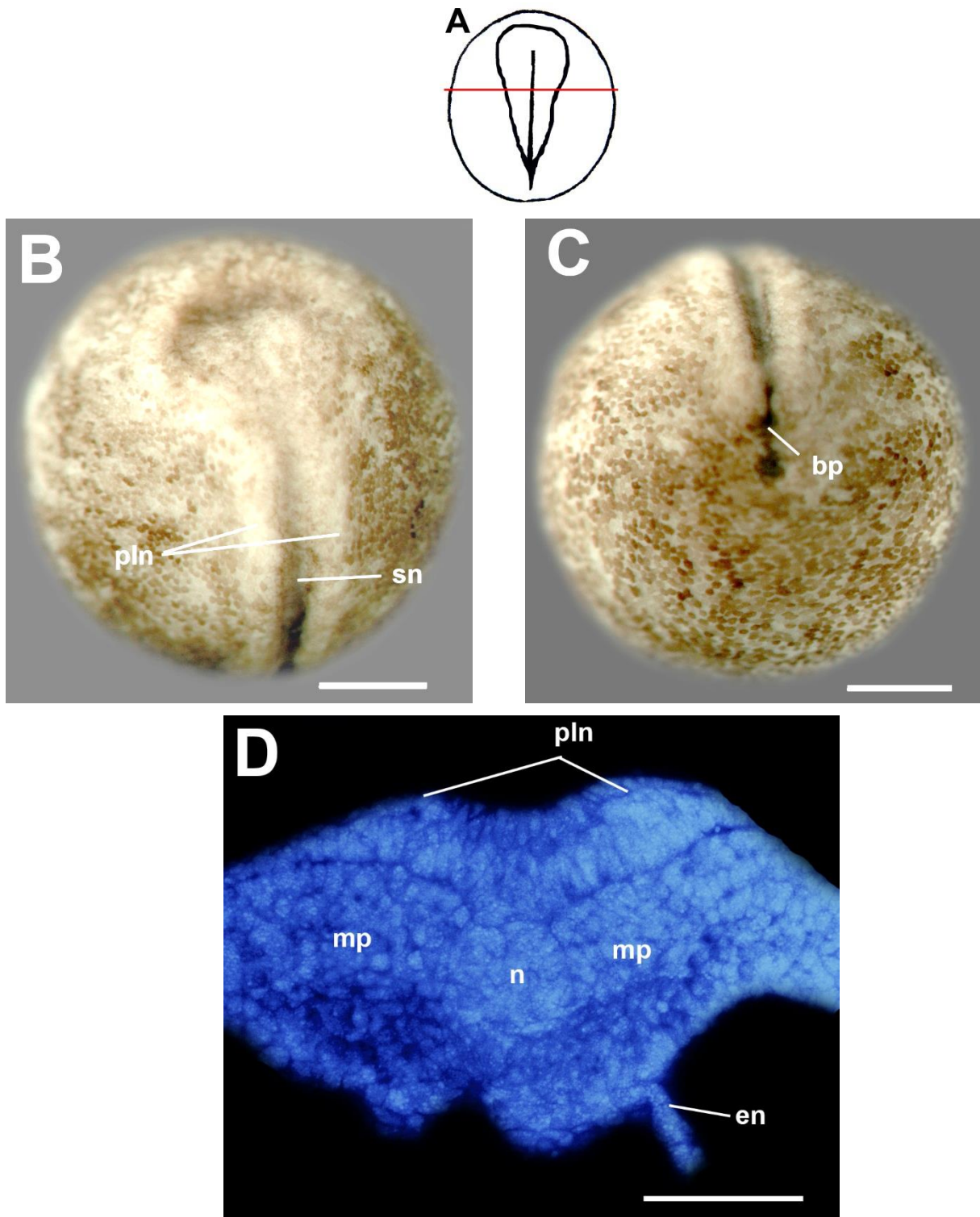
**Figura 25. Morfología del estadio de post-gástrula de *E. callistomma* en vistas externa e interna (estadio 13):** A es una vista dorsal. Región rostral hacia arriba. B es una vista dorsal del embrión. Región rostral orientada hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección transversal que se muestra en C. (B) Post-gástrula. Vista externa. La flecha indica el surco neural. (C) Vista interna del techo del arquenterón. Lado rostral orientado hacia arriba. Se observa en la parte posterior del arquenterón, el GRP y el collar circumblastoporal. (D) Fluorescencia nuclear de una sección transversal a través de la región rostral de la gástrula tardía. Se observa el notocordio, el ectodermo, el mesodermo paraxial y la placa neural. Las flechas indican los límites de las crestas endodermales laterales. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en D corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 26.



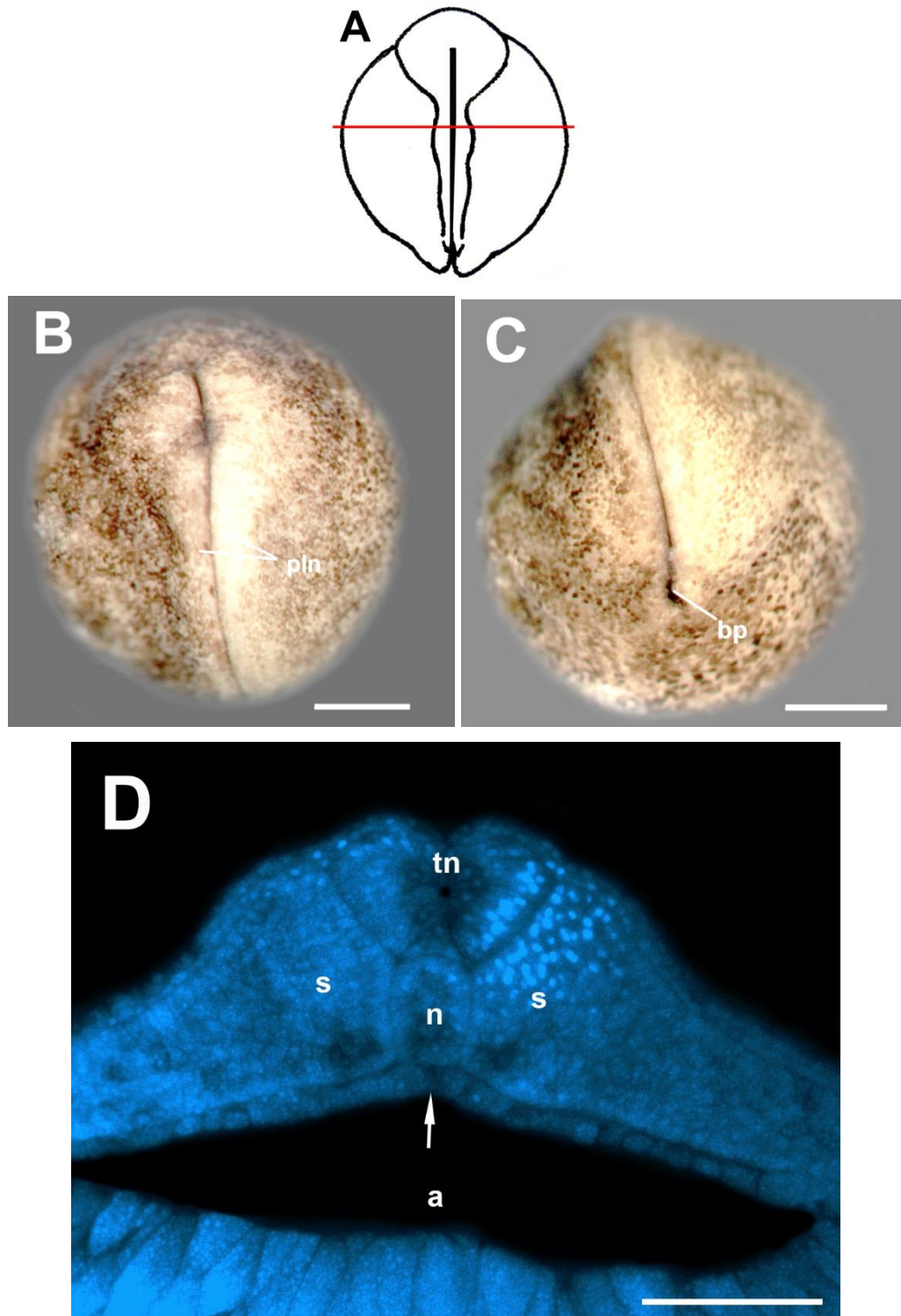
**Figura 26. Morfología de la néurula temprana de *E. callistomma* (estadio 14):** La región rostral en A y B está orientada hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de las secciones transversales que se muestran en C y D. (B) Néurula temprana. Vista externa. Se observan los pliegues neurales, la placa neural y el blastoporo. (C) Sección transversal a través de los pliegues neurales y la placa neural. Se observa el notocordio, la placa neural y el mesodermo paraxial. Las flechas indican los límites de las crestas endodermales laterales. (D) Fluorescencia nuclear de otra sección transversal. Se observa con mayor claridad el notocordio, el mesodermo paraxial y la placa neural. Las flechas indican los límites de las crestas endodermales laterales. La barra en B corresponde a 500  $\mu\text{m}$  y en C y D corresponden a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 27.



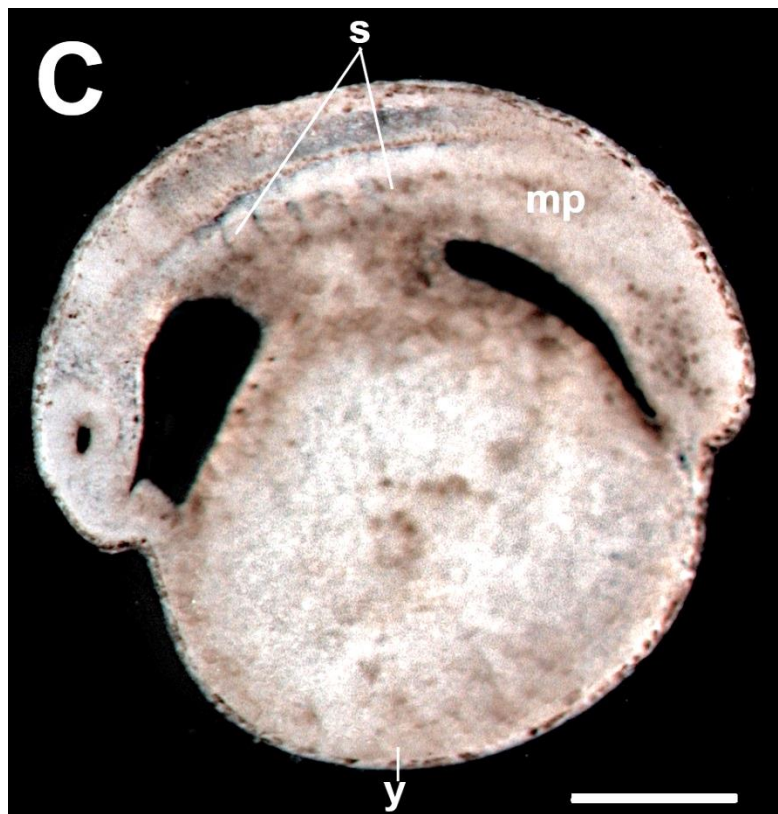
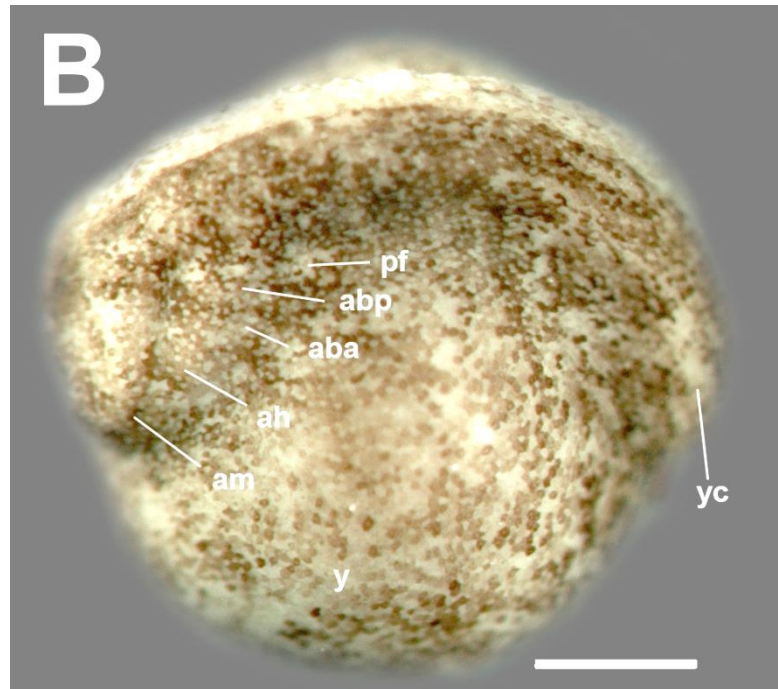
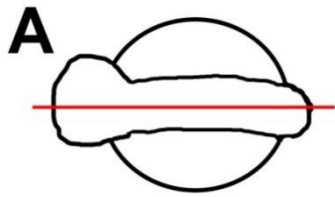
**Figura 27. Morfología de la néurula media de *E. callistomma* (estadio 15):** La región rostral en A y B está orientada hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección transversal que se muestra en D. (B) Néurula media. Vista rostral. Se observan los pliegues neurales y el surco neural. (C) Vista caudal del embrión en B. Se observa el blastoporo. (D) Fluorescencia nuclear de una sección transversal. Se observa el notocordio, los pliegues neurales, el mesodermo paraxial y el endodermo. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en D corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 28.



**Figura 28. Morfología de la néurula tardía de *E. callistomma* (estadio 16.5):** La región rostral en A y B está orientada hacia arriba. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección transversal que se muestra en D. (B) Néurula tardía. Vista externa rostral. Se observan los pliegues neurales fusionados. (C) Vista caudal del embrión en B. Se observa el blastoporo. (D) Fluorescencia nuclear de una sección transversal. Se observa el tubo neural, el notocordio. La flecha indica el recubrimiento endodermal del arquenterón. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$  y en D corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

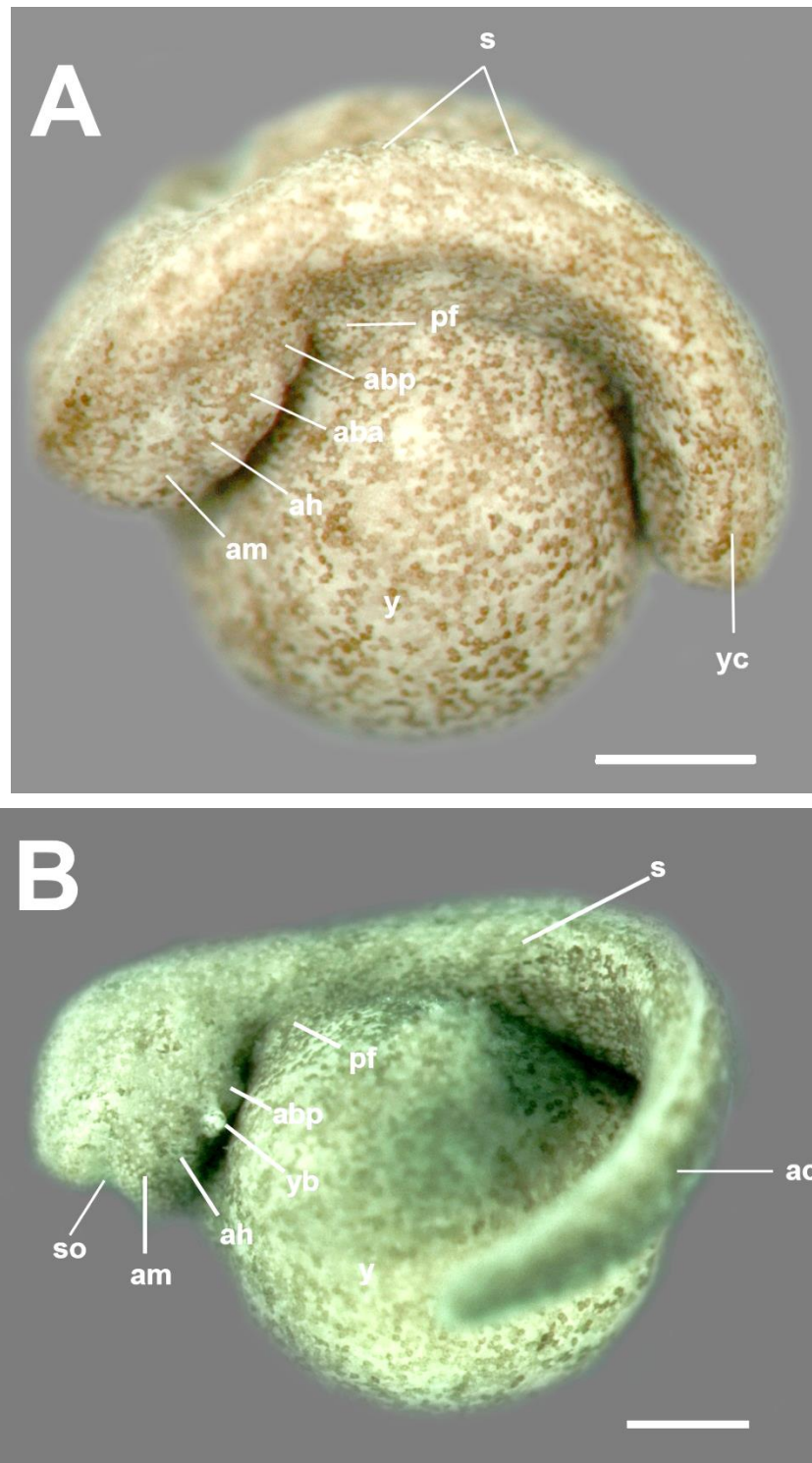
Fig. 29.



**Figura 29. Morfología del estadio de yema de la cola de *E. callistomma* (estadio 17):**

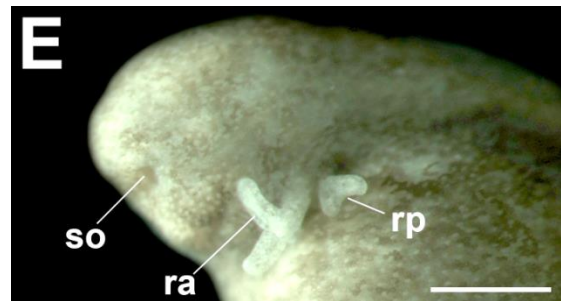
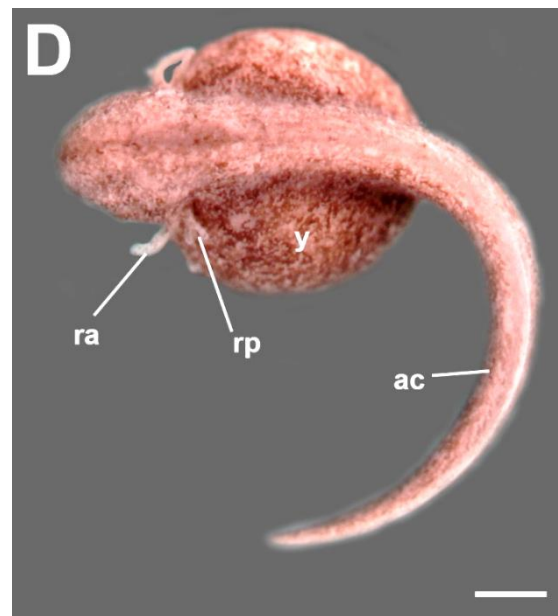
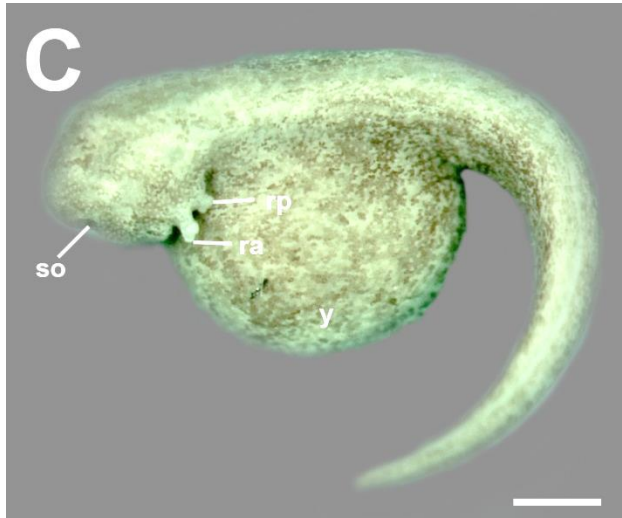
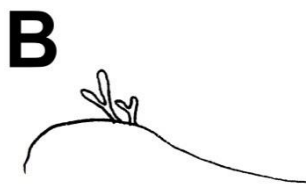
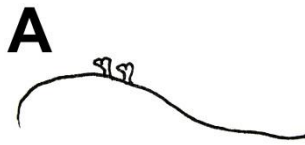
La región rostral en A, B y C está orientada hacia la izquierda. B es una vista lateral. (A) Esquema del embrión que indica la orientación de la sección sagital en C. (B) Embrión entero en el estadio de yema de la cola. Se observan los 4 arcos branquiales, los pronefros y la yema de la cola. (C) Sección sagital. Se observan los somitas y el mesodermo paraxial. Las barras en B y C corresponden a 500  $\mu\text{m}$ .

Fig. 30.



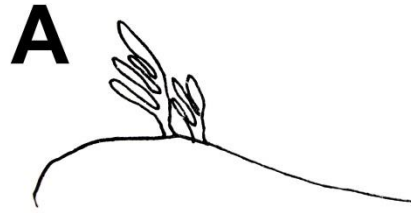
**Figura 30. Morfología del estadio de respuesta muscular y del estadio de yema de las branquias de *E. callistomma* (estadio 18 y 19):** A y B son vistas laterales. Región rostral orientada hacia la izquierda. (A) Embrión entero en estadio de respuesta muscular. Se observa el arco mandibular, el arco hioideo, el arco branquial anterior, el arco branquial posterior, los pronefros y los somitas. (B) Embrión entero en estadio de yema de las branquias. Se observa la aleta caudal, la yema de las branquias, el arco mandibular, el arco hioideo, el estomodeo. Las barras en A y B corresponden a 500  $\mu\text{m}$ .

Fig. 31.



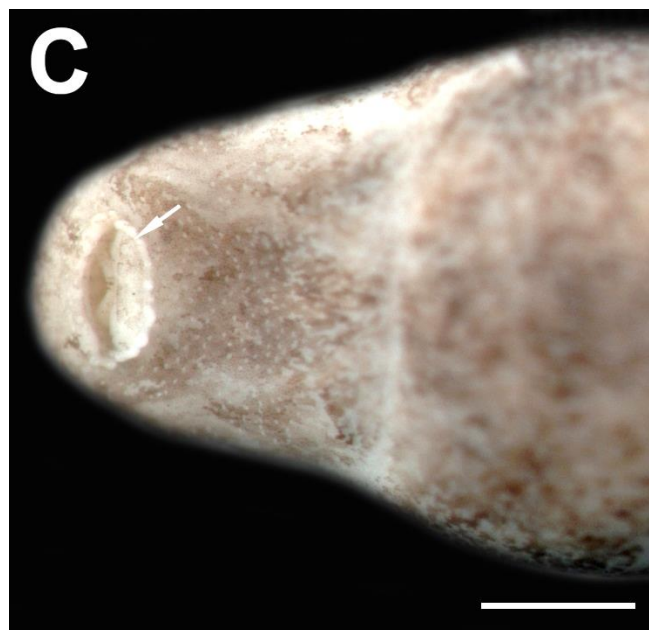
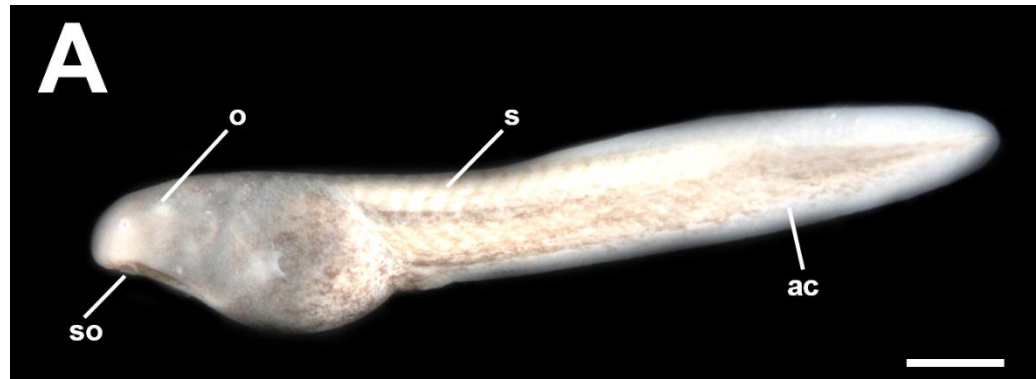
**Figura 31. Morfología de embriones en estadios de desarrollo de las branquias de *E. callistomma* (estadio 20 y 21):** La región rostral en A, B, C, D y E está orientada hacia la izquierda. (A) Esquema de las branquias en el estadio de desarrollo de las branquias. Estadio 20. La rama anterior y la posterior de las branquias poseen 2 pequeñas ramificaciones cada una. (B) Esquema de las branquias en el estadio de desarrollo de las branquias, Estadio 21. Las ramas anterior y posterior de las branquias poseen 2 ramificaciones cada una. (C) Embrión en estadio 20. Se observan las ramas de las branquias. (D) Embrión en estadio 21. Se observan las ramas de las branquias. (E) Magnificación de la cabeza de un embrión en estadio 21. Se observan las ramas de las branquias, con una mayor extensión. La rama anterior y la posterior poseen 2 ramificaciones cada una. Las barras en C, D y E corresponden a 500  $\mu\text{m}$ .

Fig. 32.



**Figura 32. Morfología del estadio de desarrollo completo de las branquias de *E. callistomma* (estadio 23):** En B y C la región rostral está orientada hacia la izquierda. (A) Esquema de las branquias en el estadio de desarrollo completo de las branquias. La rama anterior posee 4 ramificaciones. La rama posterior posee 3 ramificaciones. (B) Vista dorsal de un embrión en el estadio de desarrollo completo de las branquias. Se observan las branquias. (C) Vista lateral de un embrión en el estadio de desarrollo completo de las branquias. Se observa la aleta caudal, el ojo y las branquias. Las barras en B y C corresponden a 1 mm.

Fig. 33.



**Figura 33. Morfología de los embriones a la eclosión de *E. callistomma* (estadio 25):**

La región rostral en A, B y C está orientada hacia la izquierda. (A) Vista lateral de un embrión a la eclosión. Se observa la aleta caudal, los somitas. (B) Vista ventral de un embrión a la eclosión. Se observa el estomodeo y la aleta caudal. En este estadio no se observan branquias externas. (C) Acercamiento de la cabeza. Vista ventral. La flecha indica el disco oral. Las barras en A y B corresponden a 1 mm y en C corresponde a 500  $\mu\text{m}$ .

**9. TABLAS**

**Tabla 1. Tiempo del desarrollo, en horas y minutos, de los embriones de *H. fleischmanni* en cada postura. El tiempo 00:00 es el inicio de las observaciones.**

<b>Postura</b>	<b>Hy-001<sup>1,2</sup></b>	<b>Hy-002<sup>2</sup></b>	<b>Hy-003<sup>2</sup></b>	<b>Hy-004<sup>2</sup></b>	<b>Hy-005<sup>2</sup></b>	<b>Hy-010</b>
<b>Fecha inicio</b>	25/08/2010	25/10/2010	30/11/2010	24/01/2011	16/01/2011	18/01/2013
<b>Fecha eclosión</b>	30/08/2010					19/01/2013
<b>Estadio</b>						
<b>6</b>			00:00			
<b>6+</b>			3:00			
<b>8</b>	00:00				00:00	
<b>10</b>	2:00	00:00				
<b>11</b>	5:20					
<b>12</b>	20:30	7:00				
<b>12.5</b>		16:10		00:00		
<b>12.75</b>	26:20			5:40		
<b>13</b>		18:00			22:30	
<b>14</b>		20:00				
<b>15</b>		23:00				
<b>16</b>		28:20	48:10			
<b>17</b>	44:30			23:40		
<b>18</b>				33:10		
<b>23</b>	116:10					00:00
<b>25</b>						26:00
<b>Tiempo en días</b>	4.8					

<sup>1</sup>Hy y un número de 3 cifras representa la codificación de la postura. Hy-001= *Hyalinobatrachium fleischmanni*, primera postura.

<sup>2</sup> Los datos de estas posturas fueron tomados por Natalia Sáenz.

**Tabla 2. Tiempo del desarrollo, en horas y minutos, de los embriones de *E. callistomma* en cada postura. El tiempo 00:00 es el inicio de las observaciones.**

<b>Postura</b>	<b>Es-004<sup>1</sup></b>	<b>Es-005</b>	<b>Es-006</b>	<b>Es-007</b>
<b>Fecha inicio</b>	22/10/2012	26/11/2012	16/01/2013	18/02/2013
<b>Fecha eclosión</b>			28/01/2012	03/03/2013
<b>Estadio</b>				
<b>4</b>	00:00		00:00	
<b>6</b>	2:30	00:00		00:00
<b>8</b>	7:30	5:20		
<b>10</b>	25:10	18:20		24:00
<b>11</b>	30:20		23:50	
<b>12</b>	38:40			
<b>12.5</b>	45:50			
<b>13</b>	48:15			46:00
<b>14</b>			45:07	
<b>15</b>			48:07	
<b>16</b>		50:20	55:07	
<b>17</b>		65:20	72:52	70:30
<b>18</b>		79:20	86:02	94:45
<b>18+</b>		106:10	98:17	
<b>19</b>		126:20	111:37	
<b>19+</b>		131:40	124:27	119:10
<b>20</b>		142:45	137:27	
<b>21</b>		162:35	155:27	142:30
<b>22</b>				171:40
<b>23</b>				189:30
<b>24</b>				191:40
<b>25</b>			293:07	286:30
<b>Tiempo en días</b>			12,2	11,91

<sup>1</sup> Es y un número de 3 cifras representa la codificación de la postura. Es-004= *Espadarana callistomma*, cuarta postura.

**Tabla 3. Estadios del desarrollo de *H. fleischmanni* y *E. callistomma* en relación a la tabla de desarrollo de *Xenopus laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994) y la tabla general de Gosner (1960).**

<b>Estadios <i>H. fleischmanni</i> y <i>E. callistomma</i></b>	<b>Estadios <i>X. laevis</i></b>	<b>Estadios Gosner</b>	<b>Características de los embriones de <i>H. fleischmanni</i></b>	<b>Características de los embriones de <i>E. callistomma</i></b>
6	6	7	Embrión de 32 células	Embrión de 32 células
7	7	7+	Blástula de células grandes	
8	8	8	Blástula de células medianas	Blástula de células medianas
10	10	10	Formación labio dorsal del blastoporo	Formación labio dorsal del blastoporo
11	11	10	Gástrula temprana	Gástrula temprana
12	12	11	Tapón de yema mediano	Tapón de yema mediano
12.5	12.5	12	Tapón de yema pequeño	Tapón de yema pequeño
13	13	13	Post-gástrula	Post-gástrula
14	14	14	Néurula temprana	Néurula temprana
15	16	15	Néurula media	Néurula media
16	20	16	Néurula tardía: tubo neural	Néurula tardía: tubo neural
17	24	17	Yema de la cola	Yema de la cola
18	26	18	-	Respuesta muscular
19	33-35	19	-	Latido cardíaco/ Yema de las branquias

Tabla 3. Continuación

Estadios <i>H. fleischmanni</i> y <i>E. callistomma</i>	Estadios <i>X. laevis</i>	Estadios Gosner	Características de los embriones de <i>H. fleischmanni</i>	Características de los embriones de <i>E. callistomma</i>
20	33-40	20	-	Circulación en branquias/ Branquias anteriores y posteriores con 2 ramificaciones
21	41	21	Branquias anteriores con dos ramificaciones	Branquias anteriores y posteriores con dos ramificaciones
23	41	23	Branquias anteriores con 5 ramificaciones y las branquias posteriores con 4 ramificaciones	Branquias anteriores con 4 ramificaciones y las branquias posteriores con 3 ramificaciones
25	41	25	Eclosión. El opérculo cubre casi por completo a las branquias.	Eclosión. El opérculo cubre por completo a las branquias.

**Tabla 4. Tiempos de gastrulación. En horas y minutos, de los embriones de *H. fleischmanni* y *E. callistomma*. El tiempo 00:00 es el inicio de la gastrulación.**

	<b>Estadio</b>	<b><i>H. fleischmanni</i></b>	<b><i>E. callistomma</i></b>
<b>Inicio de la gastrulación</b>	<b>10</b>	00:00	00:00
	<b>11</b>	3:40	5:20
	<b>12</b>	18:30	13:40
	<b>12.75</b>	24:20	
<b>Final de la gastrulación</b>	<b>13</b>		22:05
	<b>Total</b>	24:20	22:05

---

Los datos de *H. fleischmanni* corresponden a la postura Hy-001 (tomados por N. Sáenz) y en *E. callistomma* a la postura Es-004 (tomados por M. J. Salazar).

**Tabla 5. Lista de fotografías y créditos**

<b>Figura</b>	<b>Negativo</b>	<b>Especie</b>	<b>Iluminación</b>	<b>Fecha</b>	<b>Crédito</b>
1A	SNAP-115529-0002	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	5/Octubre/2012	M. Salazar
1B	SNAP-085910-0002	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	28/Septiembre/2012	M. Salazar
1C	SNAP-144002-0001	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	14/Agosto/2012	M. Salazar
1D	SNAP-094456-0002	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	15/Agosto/2012	M. Salazar
1E	SNAP-141540-0040	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	15/Noviembre/2012	M. Salazar
1F	SNAP-151947-0001	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	11/Noviembre/2011	N. Sáenz
1G	SNAP-121819-0010	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	28/Enero/2013	M. Salazar
1H	SNAP-102441-0010	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
1I	SNAP-103728-0020	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
1J	SNAP-111529-0037	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
1K	SNAP-120846-0061	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
1L	SNAP-104158-0003	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	27/Febrero/2013	M. Salazar
1M	SNAP-123251-0077	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
1N	SNAP-124708-0014	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	12/Marzo/2013	M. Salazar
2B	SNAP-115529-0002	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	5/Octubre/2012	M. Salazar
2C	SNAP-123530-0003	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	14/Agosto/2012	M. Salazar
2D	SNAP-115954-0005	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	5/Octubre/2012	M. Salazar
3B	SNAP-131315-0017	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	16/Noviembre/2012	M. Salazar
3C	SNAP-130106-0008	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	16/Noviembre/2012	M. Salazar
3D	SNAP-154929-0010	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	1/Agosto/2012	M. Salazar
4A	SNAP-085910-0002	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	28/Septiembre/2012	M. Salazar
5B	SNAP-115221-0042	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	5/Mayo/2012	M. Salazar
5C	SNAP-122142-0018	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	20/Febrero/2013	M. Salazar
5D	SNAP-125146-0005	<i>H. fleischmanni</i>	Fluorescencia	14/Marzo/2013	M. Salazar

Tabla 5. Continuación

Figura	Negativo	Especie	Iluminación	Fecha	Crédito
6B	SNAP-135851-0029	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	15/Noviembre/2012	M. Salazar
6C	SNAP-125036-0031	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	20/Febrero/2013	M. Salazar
6D	SNAP-125658-0011	<i>H. fleischmanni</i>	Fluorescencia	14/Marzo/2013	M. Salazar
7B	SNAP-144002-0001	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	14/Agosto/2012	M. Salazar
7C	SNAP-120936-0012	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	20/Febrero/2013	M. Salazar
7D	SNAP-114339-0056	<i>H. fleischmanni</i>	Fluorescencia	6/Marzo/2013	M. Salazar
7E	SNAP-114449-0058	<i>H. fleischmanni</i>	Fluorescencia	6/Marzo/2013	M. Salazar
8B	SNAP-104527-0007	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	24/Agosto/2012	M. Salazar
8C	SNAP-155434-0036	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	30/Marzo/2013	M. Salazar
8D	SNAP-153715-0009	<i>H. fleischmanni</i>	Fluorescencia	30/Marzo/2013	M. Salazar
9B	SNAP-154844-0029	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	30/Marzo/2013	M. Salazar
9C	SNAP-152739-0004	<i>H. fleischmanni</i>	Fluorescencia	30/Marzo/2013	M. Salazar
10B	SNAP-094456-0002	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	15/Agosto/2012	M. Salazar
10C	SNAP-124359-0004	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	16/Noviembre/2012	M. Salazar
10D	SNAP-113630-0006	<i>H. fleischmanni</i>	Fluorescencia	25/Febrero/2013	M. Salazar
11B	SNAP-115345-0001	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	3/Septiembre/2012	M. Salazar
11C	SNAP-104551-0002	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	28/Septiembre/2011	N. Sáenz
11D	SNAP-153016-0029	<i>H. fleischmanni</i>	Fluorescencia	18/Enero/2013	M. Salazar
11E	SNAP-153226-0030	<i>H. fleischmanni</i>	Fluorescencia	18/Enero/2013	M. Salazar
12B	SNAP-131027-0006	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	13/Noviembre/2012	M. Salazar
12C	SNAP-131807-0009	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	13/Noviembre/2012	M. Salazar
12D	SNAP-124223-0091	<i>H. fleischmanni</i>	Fluorescencia	6/Marzo/2013	M. Salazar
13B	SNAP-160512-0032	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	12/Noviembre/2012	M. Salazar
13C	SNAP-162230-0041	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	12/Noviembre/2012	M. Salazar

Tabla 5. Continuación

Figura	Negativo	Especie	Iluminación	Fecha	Crédito
13D	SNAP-131925-0108	<i>H. fleischmanni</i>	Fluorescencia	6/Marzo/2013	M. Salazar
14B	SNAP-141540-0040	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	15/Noviembre/2012	M. Salazar
14C	SNAP-124651-0004	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	22/Marzo/2013	M. Salazar
14D	SNAP-125627-0096	<i>H. fleischmanni</i>	Fluorescencia	6/Marzo/2013	M. Salazar
15B	SNAP-151947-0001	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	11/Noviembre/2011	N. Sáenz
15C	SNAP-113942-0006	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	8/Febrero/2013	M. Salazar
16C	SNAP-154542-0007	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	17/Noviembre/2011	N. Sáenz
16D	SNAP-140401-0033	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	13/Noviembre/2012	M. Salazar
17A	SNAP-121819-0010	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	28/Enero/2013	M. Salazar
17B	SNAP-121441-0009	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	28/Enero/2013	M. Salazar
17C	SNAP-111440-0007	<i>H. fleischmanni</i>	Luz directa	15/Abril/2013	M. Salazar
18B	SNAP-102441-0010	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
18C	SNAP-153710-0023	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	8/Enero/2013	M. Salazar
18D	SNAP-124922-0003	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	5/Febrero/2	M. Salazar
19B	SNAP-103728-0020	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
19C	SNAP-103106-0013	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
19D	SNAP-135425-0003	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	23/Febrero/2013	M. Salazar
19E	SNAP-100744-0002	<i>E. callistomma</i>	Fluorescencia	6/Marzo/2013	M. Salazar
20B	SNAP-150740-0002	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	10/Enero/2013	M. Salazar
20C	SNAP-134021-0005	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	24/Febrero/2013	M. Salazar
20D	SNAP-102551-0009	<i>E. callistomma</i>	Fluorescencia	6/Marzo/2013	M. Salazar
20E	SNAP-102838-0011	<i>E. callistomma</i>	Fluorescencia	6/Marzo/2013	M. Salazar
21B	SNAP-110301-0030	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
21C	SNAP-124708-0004	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	28/Febrero/2013	M. Salazar

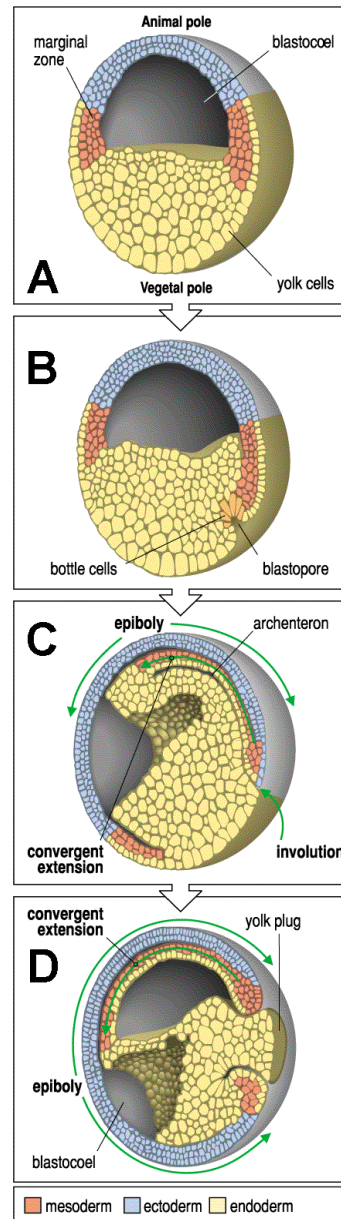
Tabla 5. Continuación

<b>Figura</b>	<b>Negativo</b>	<b>Especie</b>	<b>Iluminación</b>	<b>Fecha</b>	<b>Crédito</b>
21D	SNAP-130713-0022	<i>E. callistomma</i>	Fluorescencia	14/Marzo/2013	M. Salazar
22B	SNAP-111529-0037	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
22C	SNAP-144340-0004	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	24/Febrero/2013	M. Salazar
22D	SNAP-144712-0008	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	24/Febrero/2013	M. Salazar
22E	SNAP-130306-0019	<i>E. callistomma</i>	Fluorescencia	14/Marzo/2013	M. Salazar
23B	SNAP-112936-0043	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
23C	SNAP-115459-0001	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	28/Febrero/2013	M. Salazar
23D	SNAP-133006-0117	<i>E. callistomma</i>	Fluorescencia	6/Marzo/2013	M. Salazar
24B	SNAP-120902-0062	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
24C	SNAP-100333-0012	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	30/Marzo/2013	M. Salazar
24D	SNAP-105701-0027	<i>E. callistomma</i>	Fluorescencia	6/Marzo/2013	M. Salazar
24E	SNAP-105734-0028	<i>E. callistomma</i>	Fluorescencia	6/Marzo/2013	M. Salazar
25B	SNAP-120147-0054	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
25C	SNAP-144054-0002	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Abril/20113	M. Salazar
25D	SNAP-130952-0024	<i>E. callistomma</i>	Fluorescencia	14/Marzo/2013	M. Salazar
26B	SNAP-113853-0047	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
26C	SNAP-141136-0012	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	23/Febrero/2013	M. Salazar
26D	SNAP-110730-0034	<i>E. callistomma</i>	Fluorescencia	6/Marzo/2013	M. Salazar
27B	SNAP-122511-0071	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
27C	SNAP-122821-0074	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
27D	SNAP-112000-0040	<i>E. callistomma</i>	Fluorescencia	6/Marzo/2013	M. Salazar
28B	SNAP-113521-0008	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	14/Marzo/2013	M. Salazar
28C	SNAP-113606-0009	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	14/Marzo/2013	M. Salazar
28D	SNAP-121538-0005	<i>E. callistomma</i>	Fluorescencia	22/Marzo/2013	M. Salazar

Tabla 5. Continuación

<b>Figura</b>	<b>Negativo</b>	<b>Especie</b>	<b>Iluminación</b>	<b>Fecha</b>	<b>Crédito</b>
29B	SNAP-123251-0077	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
29C	SNAP-142657-0021	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	23/Febrero/2013	M. Salazar
30A	SNAP-122024-0068	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	19/Enero/2013	M. Salazar
30B	SNAP-125938-0030	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	30/Enero/2013	M. Salazar
31C	SNAP-123257-0007	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	30/Enero/2013	M. Salazar
31D	SNAP-134246-0041	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	30/Enero/2013	M. Salazar
31E	SNAP-163535-0027	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	28/Enero/2013	M. Salazar
32B	SNAP-124059-0004	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	4/Marzo/2013	M. Salazar
32C	SNAP-123719-0001	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	4/Marzo/2013	M. Salazar
33A	SNAP-124708-0014	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	12/Marzo/2013	M. Salazar
33B	SNAP-124756-0016	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	12/Marzo/2013	M. Salazar
33C	SNAP-105149-0004	<i>E. callistomma</i>	Luz directa	15/Abril/2013	M. Salazar

## **10. ANEXOS**



**Anexo 1. Movimiento de los tejidos durante la gastrulación en *Xenopus*:** (A) Blástula. (B) Inicio de la gastrulación. Formación de células de botella en la región del blastoporo. (C) Movimiento de involución, epíbole y convergencia y extensión. (D) Formación del tapón de yema (Modificado de: Wolpert *et al.*, 2007).

## GASTRULATION PATTERNS

Patterns/Stages	Early	Mid	Late	Post gastrula	
	10.5	12	12.5	13	14

### 1. *Xenopus* / *Engystomops*

Involution	—————				
Arch. elongation	—————				
Nt. elongation	—————				

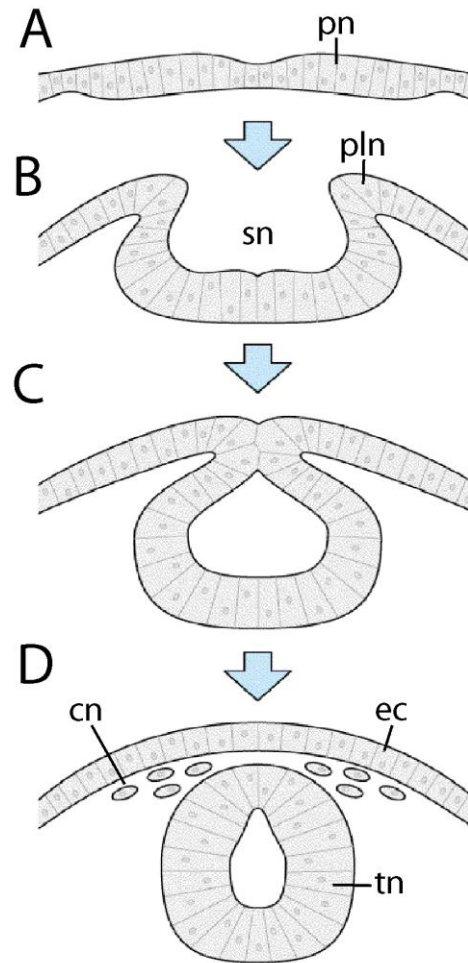
### 2. *Dendrobatids* / *E. coqui*

Involution	—————				
Arch. elongation	■■■■■ —————				
Nt. elongation	—————				

### 3. *Gastrotheca*

Involution	—————				
Arch. elongation	—————				
Nt. elongation	—————				

**Anexo 2. Patrones de Gastrulación:** Patrones de gastrulación en ranas. Tres patrones de gastrulación se han encontrado de acuerdo con la velocidad del desarrollo y el tiempo de ocurrencia de los procesos. Las barras indican que el comienzo de la involución elongación del arquenterón y notocordio en cada patrón (tomado de del Pino *et al.*, 2007).



**Anexo 3. Morfología de la formación del tubo neural.** En todas las imágenes la región dorsal está orientada hacia arriba. (A) Formación de la placa neural. (B) Levantamiento de los pliegues neurales. Se observa el surco neural. (C) Fusión de los pliegues neurales. (D) Formación del tubo neural. Se observa el ectodermo de piel y las células migratorias de la cresta neural craneal (Modificado de: Wolpert *et al.*, 2007).