PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Efecto de la disponibilidad de oxígeno y amputación de las branquias externas embrionarias en el desarrollo embrionario tardío de *Hyloxalus awa* (Dendrobatidae)

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

HEISEL CAROLINA RICAURTE MEJÍA

Quito, Noviembre de 2019

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

Andrés Romero Carvajal, Ph, D.
Director de la Disertación
Quito, 29 de noviembre del 2019

“Trabajando duro, viejo, espero hacer algo bueno algún día. No lo hago todavía, pero lo persigo y lucho”- Vincent Van Gogh.

A mi madre, mi padre, mi abuelo y mis hermanos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco cordialmente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por financiar este proyecto de investigación. A mi director Andrés Romero, por todo su apoyo, paciencia y sobre todo por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio 116 donde pude aprender muchísimo de cosas distintas y hacer lo que me gusta. Gracias por ser una gran inspiración para poder seguir adelante siempre.

A Majo Salazar por haber estado siempre presente durante toda mi tesis. A Migue Llumiquinga, por su amistad y apoyo.

A todo el lab 116, Leo, Henry, Emilio, Kary, Ery, Dani, los momentos que compartimos y todo lo que me enseñaron. Gracias a Andrés Gortaire y Bryan Polit por todo su apoyo, gran cariño y todas las experiencias que compartimos.

Gracias a todos mis maestros de la carrera. Gracias a Andrés Merino quien supo ser un gran apoyo, me enseñó muchas cosas de la vida y de la amistad.

Gracias a mis amigos de la carrera, Dani, nunca van a existir palabras para expresar mi eterno agradecimiento y mi amor hacia ti, eres lo mejor que me dio la universidad. Mateo y Andy por compartir conmigo desde el principio y darme todo su cariño. A Anto, Katy, Envy, Gonza, Pancho, Nas, Caro, Cris, Duncan, Camilo, David y mi querido Chifle. A mis grandes amigos de la vida Camila, Belén, Tebi, Pocho, Loli, Estefy, Niky, Matías, Sebas, Andre y Fernando. Les agradezco infinitamente.

A mi hermosa mamá, por estar siempre en las buenas y en las malas, por darme todo el apoyo del mundo, por ayudarme a levantar cuando caí y ser siempre mi luz, mi ejemplo y el tesoro más grande que pude tener jamás. A mi pa, mi hermano, mi hermana por todo su cariño y apoyo siempre. A mis abuelitos, tíos y mis primos. A mi Tomás. A Papu en el cielo, mi ángel, espero que esté orgulloso de mí.

A Esteban, por ser mi mejor amigo, mi compañero, mi apoyo e inspiración.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN 1
2. ABSTRACT 2
3. INTRODUCCIÓN 3
3.1. BRANQUIAS EXTERNAS EN EMBRIONES DE ANUROS 3
3.2. ECLOSIÓN Y VARIACIÓN DE OXÍGENO EN EL AMBIENTE.....5
3.3. *Hyloxalus awa* 6
3.4. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....7
3.5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN 7
3.6. OBJETIVOS 9
3.6.1. OBJETIVO GENERAL.....9
3.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 9
4. MATERIALES Y MÉTODOS 10
4.1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE EMBRIONES 10
4.2. SOLUCIONES Y FIJATIVOS.....10
4.2.1. SOLUCIÓN DE STEINBERG 1X (Rugh, 1962).....10
4.2.2. FIJATIVO DENT´S 10
4.3. PROCESAMIENTO DE EMBRIONES.....11
4.4. EXTRACCIÓN MECÁNICA DE LAS YEMAS BRANQUIALES 11
4.5. APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS DE OXÍGENO.....11
4.5.1. TRATAMIENTO DE HIPEROXIA 12
4.5.2. TRATAMIENTO DE NORMOXIA O CONTROL 12
4.5.3. TRATAMIENTO DE HIPOXIA MODERADA.....12
4.5.4. TRATAMIENTO DE HIPOXIA SEVERA.....13
4.6. ANÁLISIS DE IMÁGENES Y MORFOMETRÍA.....13
4.6.1. FOTOGRAFÍA 13
4.6.2. MEDICIONES.....13
4.7. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA, MEDIDAS Y ESTADÍSTICOS 14
4.7.1. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA 14
4.7.2. VARIACIÓN DELTA 14
4.7.3. MEDIDAS DE LA COLA.....15
4.7.4. MEDIDAS DE AUSENCIA Y PRESENCIA.....15
4.8. INMUNOTINCIÓN EN MONTAJE ENTERO.....16
4.8.1. SOLUCIONES, TAMPONES Y ANTICUERPOS.....16
4.8.1.1. TBS-Tr.....16
4.8.1.2. SOLUCIÓN DE BLANQUEO.....16
4.8.1.3. TBT… 16
4.8.1.4. TAMPÓN DIG.....16

4.8.1.5. SOLUCIÓN BCIP 16
4.8.1.6. SOLUCIÓN NBT 16
4.8.1.7. REACTIVO DE COLOR 17
4.8.1.8. BB/BA 17
4.8.1.9. ANTICUERPOS 17
4.8.2. PROCEDIMIENTO PARA LA INMUNODETECCIÓN 17
4.8.3. FOTOGRAFÍAS 18

5. RESULTADOS 19

5.1. DESARROLLO DE ESTRUCTURAS MORFOLÓGICAS DE *Hyloxalus awa* SEGÚN LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO Y LA PRESENCIA DE BRANQUIAS EXTERNAS 19
5.1.1. LONGITUD TOTAL 19
5.1.2. LONGITUD CUERPO COLA 19
5.1.3. ANCHO DE LA YEMA 20
5.1.4. FORMACIÓN DE EDEMA 20
5.1.5. ANCHO DE LA MUSCULATURA DE LA COLA 20
5.1.6. LONGITUD DE LA COLA 21
5.1.7. LONGITUD DEL CUERPO 21
5.1.8. ÁREA DE LA MUSCULATURA DE LA COLA 21
5.1.9. ÁREA DE LA ALETA DE LA COLA 22
5.1.10. VASCULARIZACIÓN DE LA YEMA 22
5.1.12. VASCULARIZACIÓN DE LA COLA 22
5.1.13. ANCHO DE LA CABEZA 23
5.1.14. BRANQUIA DERECHA 23
5.1.15. BRANQUIA IZQUIERDA 23
5.1.16. FORMACIÓN DEL CRISTALINO 24
5.2. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA DE LOS EMBRIONES DE *Hyloxalus awa* 24
5.3. INMUNODETECCIÓN EN MONTAJE ENTERO 24

6. DISCUSIÓN 26

6.1. VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OXÍGENO 26
6.1.1. HIPOXIA EN EL DESARROLLO 26
6.1.2. HIPEROXIA 28
6.1.3. NORMOXIA E HIPOXIA LEVE 30
6.2. IMPORTANCIA DE LAS BRANQUIAS EXTERNAS EN EL DESARROLLO DE *Hyloxalus awa* 31
6.2.1. REGENERACIÓN DE LAS BRANQUIAS EXTERNAS 33

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 36

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 37

9. FIGURAS 42

10. TABLAS.....53
11. ANEXOS 62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA GRÁFICO DE LOS TRATAMIENTOS. 42

FIGURA 2. EMBRIÓN DE *Hyloxalus awa* EN ESTADIO 19 43

FIGURA 3. EMBRIÓN DE *Hyloxalus awa* EN ESTADIO 23. 44

FIGURA 4. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA LONGITUD, LONGITUD CUERPO-COLA, ANCHO DE LA YEMA Y FORMACIÓN DE EDEMAS EN *Hyloxalus awa* EN ESTADIO 23. 46

FIGURA 5. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL ANCHO DE LA COLA, LA LONGITUD DE LA COLA, LONGITUD DEL CUERPO, ÁREA DE LA MUSCULATURA DE LA COLA, ÁREA DE LA ALETA DE LA COLA, VASCULARIZACIÓN DE LA YEMA Y VASCULARIZACIÓN DE LA COLA EN *Hyloxalus awa* EN ESTADIO 23.....48

FIGURA 6. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL ANCHO DE LA CABEZA, LONGITUD FR LA BRANQUIA DERECHA, LONGITUD DE LA BRANQUIA IZQUIERDA Y FORMACIÓN DEL OJO EN *Hyloxalus awa* EN ESTADIO 23.....50

FIGURA 7: SUPERVIVENCIA DE *Hyloxalus awa* SEGÚN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS. 51

FIGURA 8: INMUNOTINCIÓN EN MONTAJE ENTERO EN EMBRIONES DE *Hyloxalus awa* EN ESTADIO 23.....52

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y ERROR DE LA LONGITUD TOTAL EN *Hyloxalus awa*.....53

TABLA 2. PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y ERROR DE LA LONGITUD CUERPO- COLA en *Hyloxalus awa*.....54

TABLA 3. PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y ERROR DEL ANCHO DE LA YEMA EN *Hyloxalus awa*.....54

TABLA 4. PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y ERROR DE LA BRANQUIA DERECHA EN *Hyloxalus awa*.....55

TABLA 5. PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y ERROR DE LA BRANQUIA IZQUIERDA EN *Hyloxalus awa*.....55

TABLA 6. PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y ERROR DEL ANCHO DE LA MUSCULATURA DE LA COLA EN *Hyloxalus awa*.....56

TABLA 7. PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y ERROR CALCULADO A LA LONGITUD DE LA COLA, LONGITUD DEL CUERPO, ÁREA DE LA MUSCULATURA DE LA COLA Y ÁREA DE LA ALETA DE LA COLA DE *Hyloxalus awa* DEL DÍA FINAL BAJO LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS.....57

TABLA 8. PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y ERROR CALCULADO A PARTIR DE LAS MEDIDAS DE PRESENCIA/AUSENCIA DE VASCULARIZACIÓN DE LA YEMA, FORMACIÓN DE EDEMA, VASCULARIZACIÓN DE LA COLA Y FORMACIÓN DEL OJO EN *Hyloxalus awa* DEL DÍA FINAL BAJO LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS.. 58

TABLA 9. TABLA DE CONTINGENCIA DE LA PRESENCIA DE LA FORMACIÓN DEL CRISTALINO EN LOS EMBRIONES DE *Hyloxalus awa* SEGÚN CADA TRATAMIENTO APLICADO.....59

TABLA 10: TABLA DE CONTINGENCIA DE LA PRESENCIA DE LA YEMA EN LOS EMBRIONES DE *Hyloxalus awa* SEGÚN CADA TRATAMIENTO APLICADO.....59

TABLA 11. TABLA DE CONTINGENCIA DE LA PRESENCIA DE EDEMA EN LOS EMBRIONES DE *Hyloxalus awa* SEGÚN CADA TRATAMIENTO APLICADO.....60

TABLA 12. TABLA DE CONTINGENCIA DE LA PRESENCIA DE VASCULARIZACIÓN EN LOS EMBRIONES DE *Hyloxalus awa* SEGÚN CADA TRATAMIENTO APLICADO.....60

TABLA 13. SUPERVIVENCIA DE LOS EMBRIONES DE *Hyloxalus awa*.....61

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. PRUEBA NO PARAMÉTRICA UTILIZADA PARA UN DISEÑO FACTORIAL DE DOS VÍAS DE SCHEIRER-RAY-HARE PARA LAS MEDIDAS DE LARGO TOTAL (TL).....62

ANEXO 2. PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE DUNN PARA LAS MEDIDAS DE LARGO TOTAL (TL). 62

ANEXO 3. PRUEBA NO PARAMÉTRICA UTILIZADA PARA UN DISEÑO FACTORIAL DE DOS VÍAS DE SCHEIRER-RAY-HARE PARA LAS MEDIDAS DE LARGO CUERPO-COLA (TAL).....62

ANEXO 4. PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE DUNN PARA LAS MEDIDAS DE LARGO CUERPO-COLA (TAL). 63

ANEXO 5. PRUEBA NO PARAMÉTRICA UTILIZADA PARA UN DISEÑO FACTORIAL DE DOS VÍAS DE SCHEIRER-RAY-HARE PARA LAS MEDIDAS DEL ANCHO DE LA YEMA (YSW). 63

ANEXO 6. PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE DUNN PARA LAS MEDIDAS DEL ANCHO DE LA YEMA (YSW). 63

ANEXO 7. PRUEBA NO PARAMÉTRICA UTILIZADA PARA UN DISEÑO FACTORIAL DE DOS VÍAS DE SCHEIRER-RAY-HARE PARA LAS MEDIDAS DEL ANCHO DE LA CABEZA (HW). 63

ANEXO 8. PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE DUNN PARA LAS MEDIDAS DEL ANCHO DE LA YEMA (HW). 64

ANEXO 9. ANOVA DE LA BRANQUIA DERECHA (RG).....64

ANEXO 10. TEST DE NORMALIDAD DE SHAPIRO-WILK DE LA BRANQUIA DERECHA (RG).....64

ANEXO 11. PRUEBA POST-HOC DE TUCKEY DE LA BRANQUIA DERECHA (RG) 65

ANEXO 12. ANOVA DE LA BRANQUIA IZQUIERDA (LG).....65

ANEXO 13. TEST DE NORMALIDAD DE SHAPIRO-WILK DE LA BRANQUIA IZQUIERDA (LG).....65

ANEXO 14. PRUEBA POST-HOC DE TUCKEY DE LA BRANQUIA IZQUIERDA (LG) 66

ANEXO 15. ANOVA DEL ALTO DE LA COLA (TMH).....66

ANEXO 16. TEST DE NORMALIDAD DE SHAPIRO-WILK DEL ALTO DE LA COLA (TMH) 66

ANEXO 17. PRUEBA POST-HOC DE TUCKEY DEL ALTO DE LA COLA (TMH) ...67

ANEXO 18. ANOVA DEL LARGO DE LA COLA (TAIL).....67

ANEXO 19. TEST DE NORMALIDAD DE SHAPIRO-WILK DEL LARGO DE LA COLA (TAIL) 67

ANEXO 20. PRUEBA POST-HOC DE TUCKEY DEL LARGO DE LA COLA (TAIL) 68

ANEXO 21. PRUEBA NO PARAMÉTRICA UTILIZADA PARA UN DISEÑO FACTORIAL DE DOS VÍAS DE SCHEIRER-RAY-HARE PARA LAS MEDIDAS DEL CUERPO (BL). 68

ANEXO 22. PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE DUNN PARA LAS MEDIDAS DEL LARGO DEL CUERPO (BL).....68

ANEXO 23. ANOVA DEL ÁREA DE LA MUSCULATURA DE COLA (MA).....69

ANEXO 24. TEST DE NORMALIDAD DE SHAPIRO-WILK DEL ÁREA DE LA MUSCULATURA DE COLA (MA).....68

ANEXO 25. PRUEBA POST-HOC DE TUCKEY DEL ÁREA DE LA MUSCULATURA DE COLA (MA).....69

ANEXO 26. ANOVA DEL ÁREA DE LA ALETA DE COLA (FA) 69

ANEXO 27. TEST DE NORMALIDAD DE SHAPIRO-WILK DEL ÁREA DE LA ALETA DE COLA (FA).....70

ANEXO 28. PRUEBA POST-HOC DE TUCKEY DEL ÁREA DE LA ALETA DE COLA (FA) 70

ANEXO 29. INFORMACIÓN DE LAS POSTURAS Y DISTRIBUCIÓN DE LOS EMBRIONES DE *Hyloxalus awa* PARA CADA TRATAMIENTO.....71

ANEXO 30. INFORMACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS DE *Hyloxalus awa.*.....72

ANEXO 31. MEDICIONES MORFOLÓGICAS DE INDIVIDUOS DE *Hyloxalus awa* POR EXPERIMENTO EN EL DÍA INICIAL Y EL DÍA FINAL.. 73

ANEXO 32. DIFERENCIA DELTA DE LA MEDICIÓN MORFOLÓGICA DE LA LONGITUD TOTAL EN *Hyloxalus* awa 78

ANEXO 33. DIFERENCIA DELTA DE LA MEDICIÓN MORFOLÓGICA DE LA LONGITUD-CUERPO COLA EN *Hyloxalus awa.*.....81

ANEXO 34. DIFERENCIA DELTA DEL ANCHO DE LA YEMA EN *Hyloxalus awa*...84

ANEXO 35. DIFERENCIA DELTA DE LA BRANQUIA DERECHA EN *Hyloxalus awa* 87

ANEXO 36. DIFERENCIA DELTA DE LA BRANQUIA IZQUIERDA EN *Hyloxalus awa* 90

ANEXO 37. DIFERENCIA DELTA DEL ANCHO DE LA COLA EN *Hyloxalus awa* 93

1. RESUMEN

Existen diversos estudios sobre aspectos fisiológicos en la respiración de anuros. Si bien se conoce el proceso de formación y la importancia de las branquias internas, existe poca información sobre las branquias externas embrionarias.

El presente estudio pretende develar la importancia de las branquias externas embrionarias en el desarrollo de la rana dendrobátida *Hyloxalus awa*. Este interés surge debido a la gran diversidad morfológica de estas estructuras entre los embriones de anuros y el papel importante que se ha visto que cumplen durante la eclosión.

Para conocer la importancia de las branquias externas embrionarias durante el desarrollo tardío se realizaron amputaciones y se aplicaron tratamientos con variación de oxígeno a los embriones en el estadio 19, los cuales son hiperoxia, normoxia, hipoxia moderada e hipoxia severa. En el estadio 23 se tomaron medidas morfológicas y se analizaron. Además se realizó una inmunotinción con el anticuerpo MF20.

La hipoxia severa causó retraso en el desarrollo, branquias cortas y anchas sin irrigación sanguínea, ausencia de ojos, ausencia de aleta e irrigación sanguínea en la cola, presencia de edemas y además una mayor mortalidad entre los individuos. El tratamiento de hiperoxia evita la regeneración de las branquias amputadas sin afectar el desarrollo. En cuanto a hipoxia leve no mostró diferencias significativas con el tratamiento de normoxia, lo que indicó la tolerancia que tienen los anuros a la hipoxia hasta ciertos niveles.

Estos resultados muestran que las branquias externas embrionarias tienen un papel importante durante el desarrollo, sin embargo en ausencia de estas el intercambio gaseoso posiblemente ocurre por otras estructuras, entre ellas la piel y la cola. La hipoxia severa afecta gravemente el desarrollo pudiendo causar hasta la muerte. El hecho de que bajo estas condiciones los embriones invertían energía para regenerar branquias externas embrionarias muestra que estas estructuras son de gran aporte respiratorio. El músculo en las branquias regeneradas y las normales fue el mismo.

Palabras clave: branquias externas, intercambio gaseoso, eclosión, diversidad, adaptación.

2. ABSTRACT

There are several studies on physiological aspects in the breathing of anurans. While the formation process and the importance of internal gills are known, there is little information on embryonic external gills.

The present study aims to reveal the importance of embryonic external gills in the development of the dendrobatid frog *Hyloxalus awa*. This interest arises due to the great morphological diversity of these structures among anuran embryos and the important role that they seem to play during hatching.

To know the importance of embryonic external gills during late development, we performed amputations and applied treatments with oxygen variation to embryos in stage 19; the treatments are hyperoxia, normoxia, moderate hypoxia and severe hypoxia. In stage 23, morphological measurements were taken and analyzed. In addition, immunostaining was performed with the MF20 antibody.

Severe hypoxia caused developmental delay, short and wide gills without blood irrigation, absence of eyes, absence of fin and blood supply in the tail, presence of edema and also greater mortality among individuals. The treatment of hyperoxia prevents the regeneration of the amputated gills without affecting the development. As for mild hypoxia, it did not show significant differences with normoxia treatment, which indicated tan anurans tolerate hypoxia in certain levels.

These results show that embryonic external gills have an important role during development, however in the absence of these the gas exchange possibly occurs by other structures, including the skin and the tail. Severe hypoxia severely affects development and can cause death. The fact that under these conditions the embryos invested energy to regenerate embryonic external gills shows that these structures are of great respiratory contribution. The muscle in the regenerated and normal gills was the same.

Keywords: external gills, gas exchange, hatching, diversity, adaptation

3. INTRODUCCIÓN

En los embriones de anuros las branquias externas embrionarias fueron catalogadas como “estructuras equívocas y transitorias” (Feder y Burggren, 1992) durante mucho tiempo sin tener conocimientos importantes de estas estructuras, sin embargo estudios posteriores demostraron que las branquias externas embrionarias son importantes en el desarrollo por estar involucradas en el tiempo de eclosión (Warkentin, 2002). Además pueden posicionarse en lugares claves del huevo en donde captaban mayor cantidad de oxígeno (Kluge, 1981). Esto las convierte en un gran apoyo respiratorio para evitar la muerte por hipoxia, condición ambiental por la que atraviesan a menudo los huevos de estos vertebrados donde la difusión de oxígeno del ambiente hacia dentro del huevo disminuye y complica el desarrollo (Hastings y Burggren, 1995).

Varios estudios sobre respiración embrionaria en anfibios se han realizado en especies de las familias Bufonidae e Hylidae. Al saber de las diferencias en el desarrollo embrionario entre las familias en factores como sitio de ovoposición, tamaño de la postura, forma de la postura, capas del huevo, cantidad de oxígeno disponible en el medio y especialmente el cuidado parental al momento de la eclosión; resulta importante conocer si las branquias externas embrionarias de la especie de *Hyloxalus awa* de la familia Dendrobatidae son de importancia en su desarrollo y saber su aporte en la respiración embrionaria en situaciones de limitación de oxígeno.

3.1. BRANQUIAS EXTERNAS EN EMBRIONES DE ANUROS

Los embriones de anuros tienen respiración branquial y cutánea. Cuentas con 2 a 3 pares de branquias externas en etapas tempranas de su desarrollo (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2008) y con branquias internas hasta la metamorfosis. La organización de las branquias externas durante las fases iniciales del desarrollo es similar a las de los embriones de urodelos, en las que las branquias externas consisten de filamentos sostenidos por los arcos branquiales III, IV y V (Brunelli, Perrotta, y Tripepi, 2004). La composición de las branquias externas es simple con células basales, células del pavimento y células ciliadas que forman un delgado epitelio

formadas por las tres capas germinales. En las branquias internas los arcos branquiales llevan cuatro hileras de filamentos branquiales que se ramifican hacia la región ventral (Brunelli et al., 2004).

Las branquias externas o transitorias son una de las características más variables en el desarrollo embrionario de los anfibios por ser diversas en su extensión, complejidad y variabilidad en el desarrollo (Feder y Burggren, 1992). Las diferencias en las branquias externas pueden estar dadas por el entorno en el que se desarrollan los embriones y provocar los distintos tiempos de eclosión que encontramos en este grupo (Altig y McDiarmid, 1999).

Las branquias externas embrionarias en anuros aparecen como una pequeña yema a cada lado de la cabeza, crecen hasta llegar a la máxima extensión branquial para después poco a poco retraerse hasta estar completamente cubiertas por el opérculo. Algunas especies como *Xenopus* y varios bufónidos tienen un pobre desarrollo de branquias embrionarias. Al contrario, los hílidos y leptodactílidos poseen una considerable diversidad de extensión, forma, reabsorción y desarrollo de branquias externas embrionarias (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2008). Las branquias externas más desarrolladas se encontraron en especies con eclosión tardía, como *Phyllomedusa trinitatis*, o en especies en las que las crías cuelgan sobre estanques temporales, como *Phrynohyas venulosa*, en la cual las branquias agregaron 26–38% a la superficie corporal, lo que sugiere una adaptación flexible al entorno de incubación y eclosión (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2008).

Una especie de la familia Hylidae que ha servido como modelo para el estudio de estas adaptaciones es *Agalychnis callidryas*, estas ranas poseen branquias externas largas y un estadio de eclosión variable (Warkentin, 1995). En ella se ha visto que el mantener las branquias externas por un periodo prolongado puede ser un mecanismo fisiológico que permite el retraso de la eclosión (Warkentin, 2002). La eclosión posterior puede mejorar la supervivencia de las larvas, ya que crías más grandes y desarrolladas están en mejores condiciones de evitar y evadir a los depredadores (Warkentin, 1995).

3.2. ECLOSIÓN Y VARIACIÓN DE OXÍGENO EN EL AMBIENTE

La regresión de branquias externas en embriones de *Agalychnis callidryas* está relacionada con la cantidad de oxígeno disponible en el huevo más que a una respuesta a la eclosión (Warkentin, 2000). Se ha observado que cuando el oxígeno disminuye dentro del huevo la eclosión puede adelantarse, es decir las branquias son reabsorbidas más rápido (Warkentin, 2002). Los efectos de las fluctuaciones en la disponibilidad de oxígeno en el intercambio de gases durante la transición agua-aire se han estudiado extensamente (Burggren e Infantino, 1994). Debido a que el suministro de oxígeno a los embriones puede limitar su supervivencia, la tasa de desarrollo y el grado de desarrollo antes de la eclosión, los rasgos que afectan el suministro de oxígeno, como las branquias, también pueden limitar la plasticidad de la eclosión. Es probable que dichos rasgos evolucionen bajo selección en el momento de la eclosión (Warkentin, 2007).

Además de esta adaptación comportamental de adelantar la eclosión ante la falta de oxígeno y las respuestas fisiológicas de la reabsorción de las branquias por esta misma razón, existen respuestas morfológicas que pueden tener los embriones (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2008). La hipoxia puede causar hipertrofias en las superficies respiratorias, la superficie de intercambio de las branquias aumenta, la red capilar de la piel se vuelve más densa (agregando área de superficie respiratoria) y los capilares individuales se mueven más cerca de la superficie de la piel (reduciendo la distancia de difusión de gases en la sangre), además los genes que promueven el desarrollo de los pulmones pueden ser activados bajo estas condiciones (Burggren e Infantino, 1994).

La habilidad de los vertebrados inferiores como los anfibios de resistir a cambios extremos de oxigenación en sus ambientes ocurre debido a la diversidad de sus hábitats, morfología e historia evolutiva. En anfibios, los embriones son más tolerantes que los adultos como ocurre en la mayoría de vertebrados (Bickler y Buck, 2007).

Los embriones de anfibios pueden llegar a sufrir hipoxia en casos como el congelamiento de agua en el invierno lo que provoca una disminución drástica en la presión del oxígeno para especies acuáticas (Bradford, 2016), también al momento

de colocar las posturas, algunas especies lo hacen en masas gelatinosas espesas las cuales dificultan la difusión del oxígeno especialmente a los huevos que se encuentran en medio de las mismas (Pinder y Friet, 1994). El uso de humedales eutróficos como lugar de ovoposición (Mills, Barnhart, y Semlitsch, 2001) y la falta de oxígeno en ambientes altos de gradiente altitudinal (Dupré y Wood, 1988) también pueden causar hipoxia al embrió,.

3.3. *Hyloxalus awa*

En la especie de rana de la familia Dendrobatidae *Hyloxalus awa,* no se conoce los efectos del oxígeno en el desarrollo de las branquias, ni los cambios morfológicos que los embriones puedan tener, por lo que estudiar este tema puede ayudarnos a entender la plasticidad fenotípica de este dendrobátido.

Hyloxalus awa, la ranita cohete awa, pertenece a la familia de las ranas venenosas Dendrobatidae. Esta familia es un grupo monofilético que posee alrededor de 314 especies en 20 géneros con especies diurnas y nocturnas, con una distribución endémica en el neotrópico (Duellman, 1992). Las ranas de esta familia se caracterizan por su coloración atractiva y por su cuidado parental en el momento de la eclosión, donde generalmente el macho lleva los renacuajos a sitios de pequeñas reservas de agua como en bromelias y los depositan (Weygoldt, 1987). En algunos casos los alimentan con comida que contiene alcaloides para la defensa química desde renacuajos (Summers, McKeon y Heying, 2006).

Hyloxalus awa se distribuye en las estribaciones occidentales de los Andes y en las tierras bajas del Pacífico al noroeste de Ecuador. En Ecuador se encuentra en Esmeraldas, Imbabura, Pichincha, Carchi, Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Cotopaxi, en las regiones naturales de Bosque Húmedo Tropical del Chocó, Bosque Piemontano Occidental, Bosque Montano Occidental a una altitud de 265 a 1220 msnm (Coloma, 1995). *Hyloxalus* awa es una especie diurna, asociada a cuerpos de agua. El cuidado parental es alternado entre el macho y la hembra, donde vigilan a la postura de 4 a 21 huevos de color oscuro hasta su eclosión para posteriormente ser

trasladados en el dorso del padre hasta riachuelos cercanos o pozas permanentes de agua (Coloma, Ortiz, Frenkel, y Pazmiño-Armijos, 2019).

Al poseer cuidado parental, los embriones de *Hyloxalus awa* pueden tener menor probabilidad de morir que otros embriones cuyos padres los abandonan a su suerte, esto implicaría adaptaciones morfológicas y desarrollo branquial diferentes a otras familias.

3.4. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Debido a la diferencia en el desarrollo embrionario de la especie *Hyloxalus awa* con otras familias y a la presencia de cuidado parental es importante conocer la función de las branquias externas embrionarias y cómo estas actúan en situaciones de variación de oxígeno ya que al igual que en los hílidos las branquias de esta especie son muy ramificadas y largas, lo que indican una posible adaptación al entorno de incubación y eclosión.

Además las ranas venenosas están siendo amenazadas por el cambio climático al ser especies que se encuentran estrechamente relacionadas a cuerpos de agua que están desapareciendo (Gutiérrez, Morales y Pino, 2018). También se encuentran en peligro por el daño en su hábitat por acción del ser humano y por su tráfico ilegal como mascotas debido a sus colores llamativos (Gutiérrez et al., 2018). Más investigaciones sobre su desarrollo, ecología y método reproductivo serían un aporte importante para ayudar a su conservación.

3.5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

Basados en los antecedentes expuestos, se plantearon tres preguntas de investigación respecto a la respiración embrionaria en *Hyloxalus awa*

- ¿Cuál es la importancia de las branquias externas durante el desarrollo de los embriones de *Hyloxalus awa*?
- ¿Cómo afecta la variación de oxígeno en el ambiente al desarrollo del embrión?

- ¿Cómo afecta la variación de oxígeno a la regeneración de las branquias externas embrionarias?

3.6. OBJETIVOS

3.6.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la importancia de las branquias externas en embriones de *Hyloxalus awa* mediante la limitación de intercambio gaseoso en su medio y la amputación de las mismas.

3.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el efecto de limitación de intercambio gaseoso en el desarrollo de branquias embrionarias en *Hyloxalus awa* mediante la observación de variaciones morfológicas

- Determinar la importancia de la presencia de las branquias externas embrionarias en el desarrollo mediante la amputación de las mismas.

- Comparar el desarrollo de músculos en branquias externas de un embrión sometido a tratamientos de limitación de oxígeno con los músculos de las branquias externas de un embrión control (normoxia).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE EMBRIONES

La Iniciativa de Conservación “Balsa de los Sapos”, donó posturas de la especie de rana venenosa *Hyloxalus awa* al Laboratorio 116 de Biología del Desarrollo. Los parentales fueron colectados en la provincia de Esmeraldas de la localidad de Telembi en la reserva “Tesoro Escondido” en el 2016, los mismos que son mantenidos en cautiverio en terrarios de vidrio donde se reproducen y alimentan según la metodología de cría para dendrobátidos (Del Pino et al., 2004).

Para el mantenimiento de los embriones en el laboratorio, se colocó en una caja Petri de vidrio pequeña a cada postura, la caja poseía en el fondo papel absorbente húmedo y plástico (Del Pino et al., 2004). Cada caja fue rotulada con los datos de la postura y se hizo un registro con el nombre de la especie, el número de huevos de la postura, el código de la especie, el número de postura de esa especie, estadio de los huevos, terrario de procedencia, fecha y hora a la que se encontró el nido y observaciones adicionales.

4.2. SOLUCIONES Y FIJATIVOS

4.2.1 SOLUCIÓN DE STEINBERG 1X (Rugh, 1962)

- 58 mm NaCl
- 0.65 mm KCl
- 0.85 mm Mg SO_4
- 5 mm Tris, pH 8
- 0.34 mm Ca $(NO_3)_2$
- Agua destilada

4.2.2 FIJATIVO DENT´S

- 80% Me(OH)
- 20% DMSO

4.3. PROCESAMIENTO DE EMBRIONES

En total, se analizaron 140 embriones de *Hyloxalus awa.* Se utilizaron 10 posturas con número variable de embriones entre 8-30 cada una, las posturas provinieron de dos terrarios diferentes. Todos los embriones utilizados para realizar los experimentos se encontraban en estadio 19 (Gosner, 1960), en el cual aparecen las yemas de las branquias externas (Del Pino et al., 2004).

Para poder trabajar con los embriones, primero fueron retiradas sus capas protectoras embrionarias. Para esto, se colocaron los huevos en una caja llena de solución de Steinberg 1X (4.2.1) bajo el estereoscopio OLYMPUS y después con pinzas de disección se retiraron las capas de gelatina y la membrana vitelina.

4.4. EXTRACCIÓN MECÁNICA DE LAS YEMAS BRANQUIALES

Una vez realizado el proceso de remoción de la membrana vitelina, se elegía arbitrariamente a la mitad de los embriones para que fuesen sometidos a una microcirugía en la cual se extirparon las yemas de las branquias con pinzas de disección. Para la amputación de las yemas branquiales se colocaron a los embriones uno por uno en una caja Petri de plástico llena de Steinberg 1X. Se observó por el estereoscopio OLYMPUS que toda la yema de la branquia sea cortada desde la raíz sin lastimar otras partes del embrión. Al finalizar, con ayuda de las pinzas se aplastó ligeramente la piel excedente para formar un pequeño muñón y así evitar el ingreso de líquido o alguna infección. A los embriones a los cuales se les realizaron los cortes se los llamará “Gills cut”, mientras que a la otra mitad de los embriones de la postura que conservan intactas sus branquias se los llamará “Gills”.

4.5. APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS DE OXÍGENO

Los cuatro tratamientos que se aplicaron están dados por limitación en el intercambio gaseoso (Figura 1). Esto se consiguió mediante la creación de una columna de líquido de diferentes alturas. Así, entre más alejado de la superficie se

encuentre el embrión el intercambio gaseoso será más difícil de realizar y podrá captar menor oxígeno del medio, a pesar de que no se cuantificó el oxígeno en cada tratamiento los resultados mostraron que las cantidades de oxígeno sí varían en los tratamientos por las diferencias morfológicas ocurridas en los embriones.

Cada experimento es la aplicación de los tratamientos de hiperoxia, normoxia, hipoxia leve e hipoxia severa a una postura. El número total de embriones de la postura se dividió para 2, a la mitad se le cortó las branquias y a la otra mitad de las dejó intactas. Si era un número impar de embriones, al embrión extra siempre se le cortó las branquias. A la mitad Gills se repartió entre los 4 tratamientos y si sobraba algún embrión siempre se le aplicó el tratamiento de hipoxia severa. De igual forma se procedió con los embriones Gills cut.

4.5.1. TRATAMIENTO DE HIPEROXIA

Para conseguir una alta oxigenación en este tratamiento, se colocaron a los embriones en placas Petri de plástico con división en el medio, llenas hasta 1.5 centímetros de alto con solución de Steinberg 1X y fueron aireadas diariamente con aereadores para pecera. En cada placa siempre se colocó solamente un embrión (Fig. 1A).

4.5.2. TRATAMIENTO DE NORMOXIA O CONTROL

Se colocaron a los embriones en tubos de 2ml (un embrión por tubo siempre), llenos con 0.5 ml de solución de Steinberg 1X, similar a la cantidad de líquido vitelino. Los tubos en este tratamiento siempre permanecieron con la tapa abierta (Fig. 1B).

4.5.3. TRATAMIENTO DE HIPOXIA MODERADA

En un tubo de 2ml, se colocó solución de Steinberg 1X lleno completamente y se lo dejo con la tapa abierta, aquí se forma una columna de líquido que separa al embrión de la superficie e impide el intercambio gaseoso normal (Fig. 1C).

4.5.4. TRATAMIENTO DE HIPOXIA SEVERA

En este tratamiento se llenó completamente el tubo de 2ml con solución de Steinberg 1X, se colocó un embrión y se cerró la tapa para después cubrirla con parafilm, de esta manera se impide por completo el intercambio gaseoso (Fig. 1D).

Una vez concluido el experimento y tomadas las fotografías en estadio 23 (Gosner, 1960), se fijaron a los embriones en fijativo Dent´s (4.2.2) al 100% y fueron incubados por 2 horas a temperatura ambiente y después a -20^{o}C por 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se reemplazó el fijativo progresivamente (20%,60%,80%) por metanol 100% y se almacenaron los embriones a -20^{o}C hasta ser requeridos.

4.6. ANÁLISIS DE IMÁGENES Y MORFOMETRÍA

4.6.1. FOTOGRAFÍA

A cada embrión se le realizaron fotografías tanto al inicio de los experimentos cuando se encontraban en el estadio 19, como al final de los mismos al estar en estadio 23, donde poseen la extensión máxima de branquias externas (Del Pino et al., 2004). En el estadio 19 se realizaron fotos con el embrión en posición lateral y dorsal y si eran GC, antes y después del corte. En el estadio 23, se tomaron las fotos en posición lateral, dorsal, ventral y con las branquias extendidas. Las fotografías fueron hechas con la cámara OLYMPUS.

4.6.2. MEDICIONES

Utilizando el programa CellSense standard de la cámara del estereoscopio OLYMPUS, se eligió la opción de tomar medidas en las fotos con la herramienta “Polyline” y se las envió a un documento en Excel para ser analizadas. Las medidas que fueron tomadas son: Largo total: desde la punta de la cabeza a la punta de la cola (TL), Largo del cuerpo y la cola: por debajo del opérculo hasta la punta de la cola (TAL), Ancho del saco de yema: en el ecuador de la yema del extremo izquierdo al derecho (YSW), Ancho de la cabeza: pasando por la mitad de los ojos del extremo izquierdo al derecho de la cabeza (HW), Alto de la musculatura en la cola: en la parte más ancha de la cola (TMH), Largo de la branquia derecha (RG), Largo de la branquia izquierda (LG): tomando la medida de la rama principal de la branquia hasta el punto más lejano. Estas medidas fueron tomadas en el estadio 19 y 23. Además, se tomaron medidas adicionales en el estadio 23 como: Largo de la cola (TAIL), largo del cuerpo (BL), área de la musculatura de la cola (MA) y área de la aleta de la cola (FA). También, se observó si existía formación de ojo, vascularización de la yema, formación de edemas y vascularización de la cola y se anotó su presencia o ausencia (P/A) (Anexo 31). La resolución de las medidas es de 0.001 debido al tamaño reducido de las estructuras morfológicas. Los resultados de las mediciones se representaron en gráficos de barras para su mejor entendimiento.

4.7. ANÁLISIS DE MEDIDAS, ESTADÍSTICOS Y SUPERVIVENCIA

4.7.1. VARIACIÓN DELTA

Para los análisis de las medidas TL, TAL, YSW, HW, TMH, RG y LG, se restaron las medidas finales (estadio 23) menos las iniciales (estadio 19), se calculó el promedio, desviación media y error de cada una (Tablas 1-7) y se realizaron gráficos de barras. En los gráficos se observa la diferencia entre los embriones G y GC y cada tratamiento. Además con el valor delta de estas medidas, se realizó la prueba de Shapiro para ver la normalidad de los datos y el estadístico ANOVA factorial para las medidas que sí presentaron normalidad (TMH, RG y LF). Para las medidas que no presentaron normalidad (TL, TAL, YSW, HW) se realizó el test de Scheirer–Ray–Hare. Para ver la interacción entre los tratamientos con normalidad se utilizó el test de Tukey y en los datos sin normalidad test de Dunn.

4.7.2. MEDIDAS DE LA COLA

Medidas de la cola y el cuerpo fueron tomadas en los embriones adultos para evidenciar más el efecto de los tratamientos. Así, se midió el largo de la cola, el largo del cuerpo, el área de la musculatura de la cola y el área de la aleta de la cola. Con estas medidas se realizaron promedios por tratamiento y de igual manera se calculó la desviación media, el error estándar (Tabla 8) y se realizaron gráficos de barras. Para los estadísticos se procedió de igual forma que con las medidas anteriores. En este caso largo de la cola (TAIL), Área de la musculatura de la cola (MA), Área de la aleta de la cola (FA) son las medidas que presentaron normalidad y largo del cuerpo (BL) no presentó normalidad. Para las medidas con normalidad se realizó ANOVA, las que no presentaron normalidad se realizó el test de Scheirer–Ray–Hare. Para ver la interacción entre los tratamientos con normalidad se utilizó el test de Tukey y en los datos sin normalidad test de Dunn.

4.7.3. MEDIDAS DE AUSENCIA Y PRESENCIA

Ciertas características de los embriones denotaban retraso en el desarrollo, así que se las cuantificó como ausencia (0) o presencia (1) para evidenciar los efectos de los tratamientos. Los rasgos medidos fueron: Formación de ojo, vascularización de la yema, edema, vascularización en la cola. Se realizó un promedio con los datos, se calculó la desviación y el error (Tabla 9). Con estos datos se realizaron gráficos de barras.

4.7.4. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

Para conocer la supervivencia de los embriones en cada tratamiento se analizó la proporción de los individuos vivos por tratamiento. Una vez realizado esto, se hizo el promedio por cada uno de los 8 tratamientos, se calculó la desviación estándar y el error estándar. Con estos datos se realizaron gráficos de barras (Figura7, Tabla 15).

4.8. INMUNOTINCIÓN EN MONTAJE ENTERO

4.8.1. SOLUCIONES, TAMPONES Y ANTICUERPOS

4.8.1.1. TBS-Tr

- 1 M Tris pH 7,5
- 5M NaCl
- 0.1 % Triton-X

4.8.1.2. SOLUCIÓN DE BLANQUEO

- SSC 0,5X
- Formamida 5%
- H_2O_2 1%

4.8.1.3. TBT

- TBS-Tr
- 2 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA)
- 5% de suero de cabra

4.8.1.4. TAMPÓN DIG

- 100 mM TRIS/HCl, pH 9,5
- 100 mM NaCl
- 50 mM $MgCl_2$

4.8.1.5. SOLUCIÓN BCIP

- 50 mg/ml BCIP (Bromo-Cloro-Indol-Fosfato)
- 100% Dimetilformamida

4.8.1.6. SOLUCIÓN NBT

- 50 mg/ml NBT (Nitro Blue Tretazolium
- 70% Dimetilformamida

4.8.1.7. REACTIVO DE COLOR

- 33.75 ul solución NBT
- 17.5 ul BCIP
- 5 ml tampón Dig

4.8.1.8. BB/BA

- Benzilbenzoato: alcohol bencílico en proporción 2:1

4.8.1.9. ANTICUERPOS

4.8.1.9.1. ANTICUERPO PRIMARIO

- MF20: Anticuerpo monoclonal desarrollado en contra del fragmento ligero de la Meromiosina sarcomérica. Reacciona con las miosinas del músculo.

4.8.1.9.2. ANTICUERPO SECUNDARIO

- Anti mouse-IgG acoplado a la fosfatasa alcalina.

4.8.2. PROCEDIMIENTO PARA LA INMUNODETECCIÓN

Se realizó una inmunotinción con el anticuerpo MF20 para poder visualizar si existía alguna diferencia en el músculo de las branquias externas de los embriones según el tratamiento al que fueron sometidos. El proceso que se siguió según los protocolos establecidos por Kuratani y Horigome (2000) y por Kispert y Hermann (1994).

Se incorporaron modificaciones en el proceso de blanqueo, el cual fue realizado al segundo día después de la rehidratación. Se dejó a los embriones por tres horas o más en la solución (4.8.1.2.) hasta que presentaron un color claro.

El anticuerpo MF20 para detección de proteínas musculares, fue diluido 1:100 en solución de bloqueo y para detectarlo se usó fosfatasa alcalina acoplada al anticuerpo secundario. Se realizó un ensayo con embriones previamente fijados Dent´s, 3 por cada uno de los 8 tratamientos.

El resto del procedimiento fue seguido según el protocolo y se realizaron modificaciones en las cantidades de soluciones o reactivos según lo necesario.

4.8.3. FOTOGRAFÍAS

Una vez realizado el procedimiento de tinción y aclaramiento con BB/BA, se procedió a tomar fotografías de los embriones con la cámara del estereoscopio OLYMPUS.

5. RESULTADOS

5.1. DESARROLLO DE ESTRUCTURAS MORFOLÓGICAS DE *Hyloxalus awa* SEGÚN LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO Y LA PRESENCIA DE BRANQUIAS EXTERNAS

5.1.1. LONGITUD TOTAL

Los embriones de hiperoxia (Fig. 4 A, E, I) son levemente más pequeños que los embriones de normoxia (Fig. 4 B, F, I). Los embriones de hipoxia leve o moderada (Fig. 4C, G, I) no presentaron diferencias significativas con los embriones de normoxia. Los embriones de hipoxia severa presentaron una disminución en su tamaño (Fig. 4D, H, I). Se realizó una prueba no paramétrica de dos vías, el test de Scheirer-Ray-Hare (Anexo 1), el cual demostró que sí hay diferencias significativas en cómo afectaron los tratamientos por si solos a la longitud del embrión (valor $p< 0,05$), mientras que el corte y la interacción del corte con el tratamiento no están afectando el crecimiento (valor $p>0,05$). Según el test de Dunn (Anexo 2) realizado para comprobar cuáles tratamientos eran los más diferentes entre sí y cuales tenían efectos similares, podemos ver que hipoxia severa es el tratamiento más diferente a todos y el que mayor efecto causa. Entre los demás tratamientos también hay diferencias pero no tan marcadas como en hipoxia severa. Los embriones de hipoxia severa, con corte o sin corte, presentan un menor tamaño al resto de los embriones.

5.1.2. LONGITUD CUERPO COLA

La distancia cuerpo-cola disminuyó bajos las condiciones de hipoxia severa, mientras que en normoxia e hipoxia moderada se mantienen, también se muestra una leve disminución en condiciones de hiperoxia (Fig. 4J). Esto tiene una clara relación con la distancia de longitud total. Los análisis estadísticos de Scheirer-Ray-Hare mostraron que los tratamientos junto con el corte y el corte por sí solo no tienen un efecto significativo sobre esta medida morfológica. Por otro lado, los tratamientos por si solos sí tienen un efecto significativo (valor $p<0,05$) (Anexo 3). La prueba de Dunn nos

muestra que los tratamientos que más efecto tienen son hipoxia severa y después normoxia. En este caso también todos los tratamientos presentaron algún efecto significativo.

5.1.3. ANCHO DE LA YEMA

Las mediciones del ancho de la yema resultan ser muy variables según los tratamientos (Figura 4K). En hiperoxia los embriones a los que se les extrajeron las branquias externas embrionarias tienen una disminución notable en el crecimiento de la yema, hiperoxia e hipoxia moderada. Con branquias tienen una cantidad similar de yema. Normoxia e hipoxia severa sin branquias muestran ser igual para ambos casos. Hipoxia moderada sin branquias muestra un leve crecimiento. Los embriones que presentan un mayor tamaño de yema son aquellos sometidos a hipoxia severa Gills. Según prueba de Scheirer-Ray-Hare (Anexo 5), los tratamientos por sí solos tienen efecto sobre el tamaño de la yema (valor $p<0,05$), mientras que junto con el corte y el corte por sí solo no tienen efecto significativo. La prueba de Dunn (Anexo 6) evidenció que la mayor diferencia existe entre hiperoxia y el resto de tratamientos, siendo la diferencia más grande con hipoxia severa (Fig. 4 D, H), donde, en relación con su tamaño, se puede apreciar que el ancho de la yema es mayor al resto. Esto también ocurre por la presencia de edemas.

5.1.4. FORMACIÓN DE EDEMA

Los edemas se formaron en todos los tratamientos de Gills cut, siendo hipoxia severa el tratamiento que más edemas produjo. En los embriones Gills, la cantidad de embriones con edema es mucho más alta en hipoxia severa y disminuye en hipoxia moderada (Fig. 4L). Los embriones de hipoxia severa la mitad formaron edema y la mitad no (Tabla 14). En el resto de tratamientos no se observó edema.

5.1.5. ANCHO DE LA MUSCULATURA DE LA COLA

Cada tratamiento provoca que el ancho de la cola sea diferente, además el corte de las branquias también tiene efectos (Fig. 5I, Anexo 15). En el gráfico de la prueba de Tuckey (Anexo 14), podemos ver que hipoxia severa es la que más difiere en sus efectos con respecto a todos los tratamientos, normoxia e hipoxia moderada son similares e hiperoxia es muy similar a normoxia e hipoxia moderada.

5.1.6. LONGITUD DE LA COLA

El largo de la cola al día final muestra tener diferencias altamente significativas según los tratamientos aplicados ($p<0,05$) y un efecto de los cortes significativo (Fig. 5J, Anexo 18). Normoxia e hipoxia moderada tiene efectos similares sobre los embriones, mientras que hipoxia severa e hiperoxia sí tienen diferencias en sus efectos (Anexo 20).

5.1.7. LONGITUD DEL CUERPO

Los tratamientos tienen un efecto similar a excepción de hiperoxia con branquias, que presentan un mayor tamaño del cuerpo que el esperado (Fig. 5k). Esto lo podemos también comprobar en los estadísticos (Anexo 21) donde tanto el tratamiento como el corte tienen efectos altamente significativos ($p<0,05$). De todos los tratamientos los que tuvieron efectos más diferentes sobre el crecimiento del cuerpo de los embriones son hipoxia severa y segundo hiperoxia (Anexo 22).

5.1.8. ÁREA DE LA MUSCULATURA DE LA COLA

El crecimiento de la musculatura de la cola se ve afectado bajo el tratamiento de hipoxia severa y un poco en hiperoxia (Fig. 5L). Según el ANOVA realizado para esta medida (Anexo 23) los tratamientos tienen un efecto altamente significativo sobre esta medida morfológica, a diferencia del corte de las branquias. De los tratamientos el que

tiene efectos más diferentes del control es hipoxia severa y el que más se parece es hipoxia moderada (Anexo 25).

5.1.9. ÁREA DE LA ALETA DE LA COLA

Con esta medida podemos ver un patrón de crecimiento similar al de la musculatura de la cola, siendo hipoxia severa la que más afecta al tratamiento, seguido de hiperoxia (Fig. 5M). Tanto los tratamientos como los cortes muestran tener efectos significativos ($p<0,05$), de estos normoxia e hipoxia moderada no presentan diferencias en sus efectos, mientras que hipoxia severa es el que más se diferencia del tratamiento control (Anexos 28-28).

5.1.10. VASCULARIZACIÓN DE LA YEMA

La vascularización de la yema es otra de las características que no se pudieron observar bajo el tratamiento de hipoxia severa, en los tratamientos restantes esta es una característica fácil de apreciar (Fig. 5N). En los embriones Gills, todos los tratamientos a excepción de hipoxia severa tuvieron la yema vascularizada. Esto mismo ocurrió en embriones Gills cut, excepto 1 embrión de 17 en hiperoxia que no presentó esta característica (Tabla 13).

5.1.11. VASCULARIZACIÓN DE LA COLA

Esta característica de igual forma que las anteriores, se vio drásticamente afectada bajo el tratamiento de hipoxia severa (Fig. 5O). En hipoxia severa solo un embrión Gills presentó vascularización y solamente un embrión de hiperoxia con branquias no la presentó. Todos los embriones Gills cut presentaron vascularización, solo uno de hipoxia severa mostró vascularización incompleta (Tabla 15).

5.1.12. ANCHO DE LA CABEZA

La hipoxia severa causó una drástica disminución en el tamaño de la cabeza. La hiperoxia causó que esta crezca más que el control. El resto de tratamientos tienen un efecto similar (Fig. 6I). Según el test realizado (Anexo 7) los tratamientos presentan diferencias entre ellos, los cortes también tienen efecto ($p<0,05$). En la prueba de Dunn (Anexo 8), se observó que el tratamiento que difiere más en sus efectos de los otros es hipoxia severa.

5.1.13. BRANQUIA DERECHA

Las branquias sin ser cortadas crecen más en normoxia e hipoxia moderada y disminuyen el crecimiento en hiperoxia y aún más en hipoxia severa. Las branquias regeneran más en normoxia e hipoxia moderada, después existe una menor regeneración en hiperoxia y por último en hipoxia severa (Fig. 6J). Al realizar el test de Shapiro-Wilk, estos datos sí presentaron normalidad (valor $p>0,05$) por lo que se procedió a realizar pruebas paramétricas. Según el ANOVA (Anexo 9), tanto los tratamientos, como el corte de las branquias tienen efecto sobre el crecimiento de las mismas. Los tratamientos con efecto más parecidos entre sí son hiperoxia e hipoxia severa, hipoxia moderada y normoxia, el efecto más diferente ocurre entre hipoxia moderada e hipoxia severa, el resto de tratamientos tienen diferencias significativas igualmente (Anexo 11).

5.1.14. BRANQUIA IZQUIERDA

Las branquias izquierdas sin corte llegan a crecer más en normoxia e hipoxia leve. Disminuyen el crecimiento en hiperoxia y aún más en hipoxia severa. Las branquias Gill cut que más regeneran son normoxia e hipoxia moderada, después existe una menor regeneración en hiperoxia y por último en hipoxia severa (Fig. 6K). Tanto el

corte como los tratamientos tienen efectos significativos (Anexo 12). Los tratamientos que más se parecen son normoxia e hipoxia moderada, el resto tiene efectos diferentes sobre el crecimiento de las branquias. La mayor diferencia existe entre normoxia e hipoxia severa (Anexo 14).

5.1.15. FORMACIÓN DEL CRISTALINO

La formación del ojo fue una de las características más notables que nos permitió observar claramente el efecto de los tratamientos, principalmente el de hipoxia severa donde los embriones no desarrollaron su ojo. En contraste, esto no ocurre en los otros tratamientos donde la formación es común (Fig. 6L). En el caso de hiperoxia Gills, 2 embriones de 12 en total tuvieron un ojo parcialmente formado. En hipoxia moderada Gills 1 no formó y 1 formó parcialmente. En normoxia Gills el 100% de embriones formaron un ojo. En cuanto a los embriones Gills cut, el caso es similar, siendo los de hipoxia severa los que claramente tienen problemas en desarrollar su ojo (Tabla 12).

5.2. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA DE LOS EMBRIONES DE *H. awa*

Como podemos ver en gráfico de supervivencia (Figura 7, Tabla 15), la mayor cantidad de embriones que sobrevivieron son los que estuvieron en el tratamiento de hiperoxia, esto tanto para embriones Gills como Gills cut. El menor porcentaje de embriones que sobrevivieron son los de hipoxia severa, siendo aún más drástica la disminución en aquellos cuyas branquias estaban intactas. Entre normoxia e hipoxia moderada hay muy poca diferencia.

5.3. INMUNODETECCIÓN EN MONTAJE ENTERO

En la figura 8 podemos observar que la detección de proteína muscular en las branquias externas embrionarias ocurre únicamente en la raíz de las mismas, la cantidad de esta no varía, en todos los tratamientos se puede observar la tinción de

manera similar, esto nos indica que las estructura muscular de las branquias regeneradas es la misma que de las intactas.

6. DISCUSIÓN

6.1. VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OXÍGENO

6.1.1. HIPOXIA EN EL DESARROLLO

La hipoxia es un factor de estrés ambiental por la disminución de oxígeno en el medio que puede tener efectos profundos en los embriones y renacuajos de anuros. Por ejemplo, los niveles de oxígeno inferiores a 12,2 kPa pueden retrasar el desarrollo embrionario y, en algunos casos, aumentar la tasa de mortalidad embrionaria y larvaria (Bernal, Alton, Cramp, y Franklin, 2011). Esto se comprobó en la tasa de supervivencia de *Hyloxalus awa* (Figura 7, Tabla 15) donde los embriones sometidos a hipoxia severa tenían una menor tasa de supervivencia que en el resto de tratamientos. De todas formas existieron embriones que lograron sobrevivir hasta el final del experimento, esto indica que en efecto los anuros, y en particular esta especie, tienen cierta tolerancia a la hipoxia.

Entre los mecanismos mencionados por Bickler y Buck (2007) para que los organismos puedan soportar las condiciones de anoxia son: Supresión metabólica profunda, tolerancia a las alteraciones iónicas y del pH, y mecanismos para evitar la lesión por radicales libres durante la reoxigenación. Una de las razones de mayor muerte celular durante la hipoxia es la liberación de calcio intracelular $[Ca_2 +]_i$ que causa una muerte neuronal rápida en mamíferos después de una exposición de alrededor de 10 minutos a hipoxia; en contraste las células del cerebro anterior de los embriones pueden sobrevivir a una hipoxia prolongada y tolerar aumentos sustanciales de la liberación del $[Ca_2 +]_i$ (Hedrick, Fahlman, y Bickler, 2005).

La ralentización del desarrollo por medio de la disminución de la tasa metabólica es otra manera que tienen los embriones de sobrevivir a la hipoxia. Esto sucede en muchas especies, incluso en aquellas que atraviesan torpor. En embriones de *Rana muscosa* ocurre una disminución en la actividad cardiaca, cerebral y respiratoria. Además de una declinación de la masa corporal húmeda del tracto digestivo (Bradford, 1984). En embriones de *Rana catesbeiana* se dieron ciertos cambios en las estructuras morfológicas para la respiración, así la piel se volvió más delgada,

reduciendo a la mitad la barrera de agua y sangre. La barrera de difusión de gas de los pulmones permaneció inalterada, pero el volumen y la densidad de la pared del pulmón aumentaron significativamente. Las branquias externas de *R. catesbeiana* mostraron un marcado aumento de tamaño en la hipoxia, tanto en el número de filamentos branquiales como en el tamaño de cada filamento, además la frecuencia de respiración y el consumo de oxígeno branquial aumentan en un medio hipóxico para poder mantener el nivel de O_2 estable (Burggren y West, 1982). En cuanto al grosor y el peso de la piel de la cola no fueron muy diferentes entre las poblaciones hipóxicas y normóxicas, pero la densidad de la malla capilar fue más del doble y en las poblaciones hipóxicas la vía de difusión mínima entre la sangre y el agua disminuyó en un 58% (Pinder y Burggren, 1983).

En *H. awa* podemos asumir que existe una disminución en la tasa metabólica ya que los embriones no se desarrollan de manera adecuada, presentando ausencia de ojos (Figura 6L), branquias cortas y gruesas (Figura 6 D, H, K, L) que por la relación superficie/volumen les pueden ayudar a captar más oxígeno; menor tamaño (Figura 4I), que le ayuda a no perder gran cantidad de oxígeno por la piel (Feder, 1983) y poca o nula vascularización en partes del cuerpo como cola y yema debido al débil funcionamiento del corazón (Figura 5 N, O). Al finalizar el experimento, los embriones se encontraban en estadio 23, sin embargo el aspecto de los embriones sometidos a hipoxia severa es de uno en estadio 21 (Del Pino et al., 2004).

Una característica significativa que vio Bradford (1984) durante sus experimentos de hipoxia con *R. muscosa* fue que los renacuajos ganaban peso. Sin embargo, el contenido graso y el tracto digestivo reducían su masa. Este aumento se daba por la producción de edemas dentro del cuerpo. Al permanecer constante la tasa de difusión de iones, la energía para transportarlos debería aumentar, sin embargo bajo hipoxia disminuye, provocando un aumento en la concentración de lactato a lo que el organismo responde con un aumento del volumen de líquido corporal. En los embriones de *H. awa* se observó que en hipoxia severa, una gran proporción de embriones presentó edemas (Fig. 4L).

La depresión de la tasa metabólica por hipoxia no compensa el gasto metabólico provocado por la eclosión retrasada (Mills y Barnhart, 1999). La eclosión libera a los embriones de una barrera de difusión de la cápsula del huevo y les permite una

exposición directa de piel, branquias o pulmones al aire, por lo tanto, la hipoxia es el estímulo más probable para eclosionar en los anfibios (Warkentin, 2002).

La hipoxia puede inducir cambios fisiológicos y de comportamiento, incluyendo aumentos en niveles de actividad, frecuencia ventilatoria y frecuencia de la respiración aérea, que a su vez puede aumentar el riesgo de depredación (Feder, 1984; D. Bradford y Seymour, 1988). *Hyloxalus awa* tiene cuidado parental (Luis Coloma et al., 2019), como la mayoría de los miembros de la familia Dendrobatidae (Brown, Morales, y Summers, 2010), por lo que existe la posibilidad de que los padres puedan ayudar a sobrevivir a los embriones. Se necesitan realizar más estudios para poder comprobar esto.

6.1.2. HIPEROXIA

En *H. awa* podemos ver que al igual que en *R. catesbeiana* (West y Burggren, 1982) la respiración branquial disminuye en condiciones hiperóxicas. Esto se hace evidente en los individuos sometidos a hiperoxia tanto “Gills” como “Gills cut”, ya que la longitud branquial es significativamente menor al control en normoxia ($p>0.05$) (Figura 6 D, H, K). *Rana catesbeiana* (estadio 16-19) no realiza respiración pulmonar en hiperoxia, mientras que en normoxia sí existe poca ventilación pulmonar. Además, en hiperoxia la frecuencia de ventilación branquial, la amplitud del ciclo de ventilación branquial y flujo de agua a través de las branquias, bajaron por los niveles de normoxia mientras que la utilización de oxígeno aumentó**.**

Estos datos indican que la presión del oxígeno (PO_2) ejerce un fuerte control sobre la ventilación de las branquias y los pulmones. Además, existe una interacción entre la ventilación branquial y pulmonar, de manera que el inicio de una alta frecuencia de ventilación pulmonar en la hipoxia moderada y severa promueve una supresión de los ciclos de ventilación branquial (West y Burggren, 1982).

El hecho que los individuos de *R. catesbeiana* hayan mostrado una reducción más marcada en la amplitud del ciclo de ventilación branquial en la hipoxia e hiperoxia sugiere una mayor sensibilidad al oxígeno en ambos extremos de su rango ambiental (West y Burggren, 1982). Las branquias externas embrionarias de *Hyloxalus awa* son

más delgadas y cortas en hiperoxia en “Gills”, y en el “Gills cut” estas apenas regeneraban (Fig. 6 A, E, J, K). En hipoxia tampoco alcanzaban un gran tamaño (Fig. 6 D, H) pudiendo asumir una leve respiración branquial bajo estos dos tratamientos.

En estadios tempranos de *Rana catesbeiana,* los cambios significativos en la ventilación branquial fueron más lentos en respuesta a la hipoxia que a la hiperoxia, esto puede resultar por una mezcla de agua inspirada con agua que ya reside en las cavidades bucal, faríngea y branquial. Esta mezcla puede elevar la PO_2 del agua sobre las branquias externas embrionarias y hacer que el estímulo hipóxico sea bastante menor en comparación a la elevación del PO_2 después de la inspiración del agua hiperóxica. La inspiración del agua hiperóxica presentaría una señal mucho mayor para los receptores sensibles al O_2 que la inspiración del agua hipóxica (Jia y Burggren, 1997). La hipoxia acuática estimula la ventilación pulmonar, pero se vuelve progresivamente menos efectiva para estimular la ventilación branquial (Burggren y Doyle, 1986). La hiperoxia disminuye la ventilación branquial en las larvas. Los cambios en los niveles ambientales de CO_2 tienen poco efecto en la ventilación de las branquias o los pulmones en larvas en estadio III-X, lo que indica que la PO_2 acuática es el factor principal en el control respiratorio de la larva (Jia y Burggren, 1997).

Además los embriones de *H. awa* presentaron del 90 al 100% vascularización de la yema, formación completa del ojo, vascularización de la cola y solo 1 de 16 presentó edema en Gills cut (Tablas 9-12), esto indica que tienen un desarrollo normal y que existen otras estructuras por las que pueden respirar, en este caso se estima que sea la piel, por los estudios realizados en *Rana castabeiana* (West y Burggren, 1982; Burggren y Doyle, 1986; Burggren e Infantino, 1994) y la cola.

La cola fue otra estructura que no mostró ser afectada por la hiperoxia. Medidas de la cola como la longitud, el ancho, el área de la musculatura y el área de la aleta (Fig. 5 I, J, L, M) no son significativamente diferentes de normoxia. A diferencia de las branquias que en normoxia crecían pero en hiperoxia no o muy poco, la cola no se ve afectada por el aumento de oxigenación, esto indica que puede ser un órgano de respiración importante bajo estas condiciones.

En cuanto a cambios morfológicos en *Rana catesbeiana*, no hubo diferencias significativas en las medidas de los órganos de intercambio gaseoso entre hiperoxia

y normoxia, incluyendo área pulmonar, grosor de la piel, largo de las branquias y piel de la cola (Burggren y Mwalukoma, 1983). Ya que existe una falta de respuestas morfológicas a la hiperoxia, una disminución en la afinidad a la hemoglobina o una disminución en la capacidad de reducir los niveles de O_2 en la sangre en respuesta a la hiperoxia dejaría a un animal poco aclimatado para una hipoxia incluso transitoria (Pinder y Burggren, 1983).

6.1.3. NORMOXIA E HIPOXIA LEVE

Estudios realizados en varios anuros como en *Xenopus laevis* (Hastings y Burggren, 1995), *Phyllomedusa trinitatis* (Downie et al., 2013), *Agalychnis callidryas* (Rogge y Warkentin, 2008), *Dendropsophus ebraccatus* (Touchon y Warkentin, 2008) *Hyloxalus nexipus* e *Hyloxalus elachyhistus* (Negrete, 2018), han demostrado que los renacuajos de estas especies tienen tolerancia a la hipoxia e incluso que la hipoxia leve no tiene grandes efectos sobre su fisiología o morfología.

En el caso de *Hyloxalus awa* podemos observar que ninguna de las medidas morfológicas tomadas, ni los datos de presencia y ausencia fueron diferentes del tratamiento control normoxia (Fig. 4, 5, 6). En las fotografías de los embriones en el último día podemos ver que tienen un gran parecido al control (Figura 4 B, C, F, G), la mayor diferencia que poseen es el largo de las branquias que no llegan a ser de la extensión de aquellas en normoxia, en algunos casos existieron curvaturas en las columnas y también se observó un ligero retraso en el desarrollo del ojo y cabeza más pequeña (Figura 8, Fotos F y G, F´ y G´), sin embargo según los estadísticos estos datos no mostraron ser significativamente diferentes del control.

La familia Dendrobatidae posee tolerancia a la hipoxia debido a la gran diversidad de lugares de incubación que existen y, al igual que *Hyloxalus nexipus* e *Hyloxalus elachyhistus* (Negrete, 2018)*, Hyloxalus awa* posee plasticidad a la hipoxia moderada por su similitud en el modo reproductivo y las condiciones naturales donde se encuentran los nidos.

6.2. IMPORTANCIA DE LAS BRANQUIAS EXTERNAS EMBRIONARIAS EN EL DESARROLLO DE *H. awa*

A medida que el desarrollo avanza, los embriones de anuros deben superar las limitaciones de oxígeno por factores que dificultan la difusión hacia el embrión como las envolturas del huevo (como capa gelatinosa), forma, tamaño de la postura y lugar de ovoposición. La hipoxia generada puede retardar el desarrollo y disminuir la supervivencia, pero además seleccionar rasgos que mejoren el suministro de oxígeno a los embriones. Tanto los cuidados parentales como características de los mismos embriones han mostrado ser estos rasgos seleccionados (Rogge y Warkentin, 2008).

Los embriones de los anuros tienen varias superficies respiratorias que están bien desarrolladas para el intercambio gaseoso, incluidas las branquias internas y externas, el opérculo vascularizado, la piel y pulmones, estructuras que han mostrado mejorar la difusión de oxígeno y evitar la muerte por hipoxia (Lenfant y Johansen, 1967; Feder, 1983). De estas, las branquias externas son de especial interés, ya que se conoce que tienen una gran diversidad de formas, tamaños, complejidad e importancia al momento de la eclosión. En los dendrobátidos las branquias externas poseen una forma simple al inicio de su crecimiento, presentándose como yemas en los extremos de la cabeza (Figura 2, RG y LG). En *H. awa* tienen una longitud promedio de 0,3 mm en el estadio 19 (Anexo 31) y en el estadio 23, cuando poseen la extensión máxima de branquias, el filamento principal puede llegar a medir hasta 3.8 mm en normoxia y tiene 7 ramificaciones secundarias, recubiertas de las 3 capas germinales, con irrigación sanguínea y motilidad (Figura 3, RG y LG).

En algunos miembros de la familia Hylidae como *Phyllomedusa trinitatis, Phyllodytes auratus, Phrynohyas venulosa* y *Agalychnis callidryas* se han encontrado las branquias externas más desarrolladas, teniendo una gran longitud y complejidad en sus ramificaciones, brindándoles hasta un 30% más en superficie respiratoria. En estos embriones se vio que dos factores parecen estar asociados con las branquias externas bien desarrolladas: eclosión tardía y entornos de incubación especializados donde el oxígeno puede ser limitado (Nokhbatolfoghahai, Downie, y Atherton, 2013). En el caso de los embriones de *H. awa*, la eclosión es temprana y las branquias son

útiles para mejorar la respiración posteclosión (Nokhbatolfoghahai et al., 2013) dentro de los estanques naturales, donde son transportados por sus padres.

Los estudios realizados en *A. callidryas* (Warkentin, 2000; Warkentin, 2002) sugiere que la regresión de las branquias muestra plasticidad según la disponibilidad del oxígeno, así a mayores niveles de oxígeno se acelera la regresión branquial y a menores niveles se retrasa la regresión. Este suceso también fue reportado en los renacuajos de *Stephopaedes anotis* (Bufonidae) (Channing, 1993). En *H. awa* se vio que las branquias en hiperoxia tienen una longitud promedio menor a las de normoxia y en algunos casos de Gills cut incluso no regeneraron (Fig. 6 A, E, J, K), mientras que en hipoxia severa Gills estas siempre crecieron y en Gills cut siempre regeneraron (Fig. 6 D, H) , lo que concuerda con *A. callidryas,* que demuestra que a pesar de ser nominadas como estructuras “equívocas” (Feder y Burggren, 1992) estas son necesarias para la supervivencia de los embriones. La plasticidad de la eclosión y la pérdida externa de las branquias sugieren dos cosas: que la restricción en la tasa de desarrollo embrionario puede ser respiratoria y que el mantenimiento de las branquias externas puede ser necesario para que los embriones competentes para incubar continúen desarrollándose en el huevo o que la incubación puede ser necesaria para la pérdida de las branquias (Warkentin, 2007).

Las branquias externas en los embriones de *A. callidryas* son un gran aporte para la toma de oxígeno, estos embriones son capaces de regular su metabolismo y soportar PO_2 hasta por debajo del nivel crítico, siendo fundamentales para la supervivencia en hipoxia, lo que no sucede con embriones sin branquias donde su tasa metabólica disminuía incluso con la superficie del huevo expuesta en un 75% (Rogge y Warkentin, 2008). En contraste, embriones con branquias, con superficies de huevo expuestas menor al 15% se desarrollan en sincronía con huevos bien expuestos de la misma postura (Warkentin, Gomez-Mestre, y Mcdaniel, 2005). En embriones de *H. awa* se vio que bajo condiciones de hipoxia severa los embriones siempre regeneraron branquias, lo que nos lleva a suponer que estas eran de gran ayuda para poder captar la mayor cantidad de oxígeno posible, sin embargo la irrigación en las branquias, ya sean regeneradas o normales bajo estas condiciones de oxígeno, tenían poca o nula irrigación sanguínea, lo que pudo hacer que estas

estructuras no sean de gran aporte a la respiración y por eso estos embriones tuvieron una mayor tasa de mortalidad que los otros.

H. awa no mostró diferencias significativas en ninguna de las medidas morfológicas analizadas entre hipoxia leve y normoxia. Estos resultados concuerdan con los que obtuvo Negrete (2018) en los individuos con extirpación mecánica de las branquias externas. Esto sugiere que en condiciones hipóxicas las branquias cumplen con una función importante y que la regeneración es necesaria para el desarrollo normal del embrión, lo que no sucede en hiperoxia.

En *Boana* (*Hyla*) *rosenbergi* (Kluge, 1981) y *Agalychnis callidryas* (K. M. Warkentin, 2007) han sido reportados movimientos de las branquias para acercarse a los lugares del huevo donde ocurre mayor difusión en estadios donde la tasa de crecimiento aumenta, así las branquias se abren y extienden por toda la superficie expuesta, el movimiento sucede debido a fibras de músculo estriado en los filamentos primarios (Kluge, 1981). En esta posición las branquias prácticamente respiran aire y esto es visto como una adaptación a la hipoxia en estanques donde ocurre la eclosión y puede ocurrir una retención facultativa de branquias externas (Noble, 1927). Este control del posicionamiento de las branquias también se ha visto en *Phrynohyas venulosa, Phyllodytes auratus* y *Phyllomedusa trinitatis* y *P. trinitatis*. La habilidad de controlar las branquias maximiza el intercambio gaseoso, exponiendo todas las ramificaciones hacia lugares del huevo donde es más fácil la difusión del oxígeno con el medio.

6.2.1. REGENERACIÓN DE LAS BRANQUIAS EXTERNAS

Al hablar de regeneración en anfibios, los ajolotes son el principal objeto de estudio debido a sus grandes capacidades regenerativas. En anuros, se han realizado experimentos de regeneración en ojos en *Bufo melanostictus*. (Jangir, Shekhawat, Prakash, Swami, y Suthar, 2001), en la aleta de la cola de *Rana clamitans* (Procaccini y Doyle, 1970) y en su extremidad anterior (Rose, 1945), extremidad anterior en *Rana temporaria* (Polezhayev, 1946), regeneración con trasplante en *Eleutherodactylus martinicensis* (Hughes, 1962). Con los resultados obtenidos se incrementó el interés en estudiar regeneración en otras especies de anuros.

Al entender que la función de las branquias era importante para la eclosión (Warkentin, 2007), observar cómo estas regeneraban bajo condiciones de variación de cantidad de oxígeno fue de gran interés. Los estudios realizados por Negrete (2018) en los dendrobátidos *Hyloxalus nexipus* e *H. elachyhistus* mostraron que la extirpación mecánica de las branquias no afectaba el desarrollo de los embriones x. Resultados similares se habían observado en el urodelo *Amblistoma punctatum* donde individuos con branquias removidas mecánicamente se desarrollaron igualmente que los individuos con branquias bajo condiciones de normoxia e incluso en hipoxia leve (Harrison, 1921).

En *Hyloxalus awa* al amputar las branquias pudimos observar que estas se regeneraron bajo todas las condiciones de oxígeno, siendo hipoxia severa e hiperoxia en las que menos longitud tuvieron (Figura 6 J, K). Al comparar los embriones en normoxia Gills y Gills cut, no se pudo encontrar diferencia alguna en cambios morfológicos. En cuanto a supervivencia, en hiperoxia, hipoxia leve y normoxia no existieron diferencias significativas entre Gills y Gills cut, mientras que en hipoxia severa hubo mayor mortalidad en ambos grupos (Figura 7). En cuanto a la inmunodetección, no se encontró diferencias entre el músculo de las branquias normales (Figura 8 A, B, C y D) y las branquias regeneradas (Figura 8 A´, B´, C´ y D´). En ambos grupos fue detectada la meromiosina en la raíz de las branquias en una longitud de 1mm aproximadamente.

Las branquias externas están formadas de las tres capas germinales, tienen irrigación sanguínea, músculo y epidermis. Las observaciones histológicas han demostrado que el epitelio de las branquias externas se compone de células de pavimento, basales, ciliadas y células ricas en mitocondrias (MR). La epidermis de los filamentos parece consistir en una o dos capas de células epiteliales escamosas y parece ser un sitio de intercambio de gases (Uchiyama y Yoshizawa, 1992). Estudios realizados en *Ambystoma mexicanum* demostraron que el tejido nervioso es esencial para la regeneración en branquias y extremidades en el urodelo. En ausencia de los nervios, la regeneración se veía limitada o era nula, por lo que entender cuáles eran las moléculas que participan en el proceso de regeneración era de gran importancia. Así fue demostrado que Fgf2 + Fgf8 + Bmp7 puede inducir respuestas de regeneración de la extremidad en ausencia de nervios. Además, que las mismas

moléculas pueden inducir un blastema en las extremidades de *Xenopus laevis* (Saito, Nishimura, Makanae, y Satoh, 2019). Estos resultados nos permiten pensar que estas moléculas también están presentes en la regeneración de branquias en *H. awa*, sin embargo más estudios son necesarios.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las branquias externas cumplen funciones importantes en la respiración de los anuros, en *Hyloxalus awa* los embriones sometidos a hipoxia severa Gills cut invierten energía en su regeneración y logran sobrevivir a pesar de las malformaciones y retraso en su desarrollo, así que si existe el gasto energético para este proceso indica la importancia que poseen estas estructuras en la captación de oxígeno.

El hecho de que los embriones en hiperoxia no regeneran branquias muestra que pueden utilizar varias superficies respiratorias, como la piel o la cola, donde pudimos observar gran irrigación sanguínea.

Al no obtener diferencias significativas entre los tratamientos de hipoxia leve y normoxia se puede decir que existe cierta tolerancia a la hipoxia en los embriones, esto tiene relación con la capacidad adaptativa de los embriones frente a condiciones con menor disponibilidad de oxígeno. Un ejemplo de esto es el mover las branquias hacia lugares del huevo que esté más expuesta al medio ambiente.

La inmunotinción mostró que no existen diferencias entre el músculo de las branquias regeneradas y las normales, esto significa que los embriones son capaces de mover estas estructuras sin ninguna complicación cuando son regeneradas.

Es necesario realizar más estudios para conocer si los padres pueden ayudar a evitar la muerte por hipoxia durante el desarrollo embrionario.

Como siguientes pasos a realizar en la investigación están medir la cantidad de oxígeno en los tratamientos y realizar un Western blot para detectar las proteínas específicas en las branquias externas embrionarias de *Hyloxalus awa*.

Según la IUCN y La lista roja de anfibios del Ecuador, esta especie se encuentra identificada como “vulnerable” (Coloma et al., 2019) por lo que resulta importante realizar más estudios para poder conocer más sobre su modo reproductivo, ecología y embriogénesis, y así poder aportar en su conservación.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altig, R. y McDiarmid, R. W. (1999). *Body plan: Development and morphology*. Chicago, IL: University of Chicago Press. Recuperado de: https://pubs.er.usgs.gov/publication/5211011

Bernal, M., Alton, L. A., Cramp, R. L. y Franklin, C. E. (2011). Does simultaneous UV-B exposure enhance the lethal and sub-lethal effects of aquatic hypoxia on developing anuran embryos and larvae? *Journal of Comparative Physiology*, *181*(7), 973-980.

Bickler, P. E. y Buck, L. T. (2007). Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Annual Review of Physiology*, *69*(1), 145-170.

Bradford, D. (1984). Water and osmotic balance in overwintering tadpoles and frogs, *Rana muscosa*. *Physiological Zoology*, *57*(4), 474-480.

Bradford, D. y Seymour, R. S. (1988). Influence of environmental PO_2 on embrionic oxygen consumption , rate of development , and hatching in the frog *Pseudophryne bibroni*. *Physiological Zoology*, *61*(5), 475-482.

Bradford, D. (2016). Winterkill , oxygen relations , and energy metabolism of a submerged dormant amphibian , *Rana Muscosa*. *Ecology*, *64*(5), 1171-1183.

Brown, J., Morales, V. y Summers, K. (2010). A key ecological trait drove the evolution of biparental care and monogamy in an amphibian. *The American Naturalist*, *175*(4), 436-446.

Brunelli, E., Perrotta, E. y Tripepi, S. (2004). Ultrastructure and development of the gills in *Rana dalmatina* (Amphibia, Anura). Zoomorphology, 123(4), 203-211.

Burggren, W. W. y West, N. H. (1982). Changing respiratory importance of gills, lungs and skin during metamorphosis in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Respiration Physiology*, *47*(2), 151-164.

Burggren W. W., y Mwalukoma, A. (1983). Respiration during chronic hypoxia and hyperoxia in larval and adult bullfrogs (*Rana catesbeiana*) I. Morphological responses of lungs, skin and gills. *The Journal of Experimental Biology* (Vol. 105). Recuperado de: http://jeb.biologists.org/content/jexbio/105/1/191.full.pdf

Burggren, W. W. y Doyle, M. (1986). Ontogeny of regulation of gill and lung ventilation in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Respiration Physiology*, *66*(8), 279-291.

Burggren, W. W. e Infantino, R. L. (1994). The respiratory transition from water to air breathing during amphibian metamorphosis. *American Zoologist*, *34*(2), 238–246. Recuperado de: http://az.oxfordjournals.org/content/34/2/238.abstract

Channing, A. (1993). Observations on the Natural History of *Stephopaedes anotis* (Bufonidae). *Journal of Herpetology*, *27*(2), 213-214.

Coloma, L. (1995). Ecuadorian frogs of the genus *Colostethus* (Anura: Dendrobatidae). *Miscellaneous Publications of the Natural History Museum, Univ. of Kansas*, *87*(87), 1-72.

Coloma, L., Ortiz, D., Frenkel, C. y Pazmiño-Armijos, G. (2019). *Hyloxalus awa*. Recuperado el 29 de mayo de 2019 de: https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/*Hyloxalus awa*

Del Pino, E. M., Ávila, M., Pérez, O., Benítez, M. S, Alarcón, I., Noboa, V. y Moya, I. M. (2004). Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *International Journal of Developmental Biology*, *48*(7), 663-670.

Downie, J. R, Nokhbatolfoghahai, M., Bruce, D., Smith, J. M., Orthmann-Brask, N. y MacDonald-Allan, I. (2013). Nest structure, incubation and hatching in the Trinidadian leaf-frog *Phyllomedusa trinitatis* (Anura: Hylidae). *Phyllomedusa*, *12*(1), 13-32.

Duellman, W. E. (1992). Reproductive strategies of frogs. *Scientific American*, *267*(1), 80-87.

Dupré, K. y Wood, C. (1988). Behavioral temperature regulation by aquatic ectotherms during hypoxia. *Canadian Journal of Zoology*, *66*, 2649-2652.

Feder, M. E. (1983). Responses to acute aquatic hypoxia in larvae of the frog *Rana beriandieri*. *Journal of Experimental Biology*, *104*, 79-95.

Feder, M. E. (1984). Aerial versus aquatic oxygen consumption in larvae of the clawed frog ,*Xenopus laevis*. *Journal of Experimental Biology*, *245*, 231-245.

Feder, M. E. y Burggren, W. W. (1992). *Environmental physiology of the amphibians*. University of Chicago Press. Recuperado de: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=oaS-OpEjPtUC&oi=fnd&pg=PR7&dq=burggren+yjust+1992&ots=NalR80SNWy&sig=JWOEfndAAFkevPMLwF_YAF50pKE#v=onepage&q=burggren yjust 1992&f=false

Gosner, K. L. (1960). A Simplified table for staging anuran embryos larvae with notes on identification. *Herpetodologists' League*, *16*(3), 183-190.

Gutiérrez, K., Morales, R., y Pino, J. (2018). Ranas dardo venenosas (Dendrobatidae) y su importancia en la bioprospección de moléculas bioactivas en los últimos tiempos: una revisión. Revista de la UAC, *4*, 43-47.

Harrison, R. G. (1921). Experiments on the development of the gills in the amphibian embryo. *Biological Bulletin*, *41*(3), 156-170. Recuperado de: http://www.journals.uchicago.edu/doi/pdfplus/10.2307/1536747

Hastings, D. y Burggren, W. W. (1995). Developmental changes in oxygen consumption regulation in larvae of the South African clawed frog *Xenopus laevis*. *The Journal of experimental biology*, *198*(Pt 12), 2465-75. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9320393

Hedrick, M. S., Fahlman, C. S., y Bickler, P. E. (2005). Intracellular calcium and

survival of tadpole forebrain cells in anoxia. *The Journal of Experimental Biology*, *208*, 681-686.

Hughes, A. (1962). An experimental study on the relationships between limb and spinal cord in the embryo of *Eleutherodactylus martinicensi*s. *Journal of embryology and experimental morphology*, 575-601. Recuperado de: https://dev.biologists.org/content/develop/10/4/575.full.pdf

Jangir, O., Shekhawat, D., Prakash, A. y Suthar, P. (2001). Homeotic regeneration of eye in amphibian tadpoles and its enhancement by vitamin A. *Journal of Biosciences*, *26*(5), 577-581.

Jia, X. X. y Burggren, W. W. (1997). Developmental changes in chemoreceptive control of gill ventilation in larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*). I. Reflex ventilatory responses to ambient hyperoxia, hypoxia and NaCN. *Journal of Experimental Biology*, *200*(16), 2229-2236.

Kispert, A. y Herrmann, B (1994). Immunohistochemical analysis of the brachyury protein in wild-type and mutant mouse embryos. Developmental Biology 161, 179-193.

Kluge, A. G. (1981). The life history, social organization, and parental behavior of *Hyla rosenbergi* Boulenger, a nest-building gladiator frog. *Publications of the Museum of Zoology of the University of Michigan*, *160*(160), 1-170.

Kuratani, S. y Horigome, N. (2000). Developmental morphology of branchiomeric nerves in a cat shark , scyliorhinus torazame , with special reference to rhombomeres , cephalic mesoderm , and distribution patterns of cephalic crest cells. Zoological Science, *17*(7), 893-909.

Lenfant, C. y Johansen, K. (1967). Respiratory adaptations in selected amphibians. *Respiration Physiology*, *2*(2), 247-260.

Mills, N. E. y Barnhart, M. C. (1999). Effects of hypoxia on embryonic development in two *Ambystoma* and two *Rana* species. *Physiological and Biochemical Zoology*, *72*(2), 179-188.

Mills, N. E., Barnhart, M. C. y Semlitsch, R. D. (2001). Effects of hypoxia on egg capsule conductance in *Ambystoma* (Class Amphibia , Order Caudata). *Physiological and Biochemical Zoology*, 72 (2) 3747-3753.

Negrete, L. (2018). Adaptaciones a la vida terrestre: análisis fisiológico y del desarrollo de branquias embrionarias en *Hyloxalus nexipus* e *Hyloxalus elachyhistus* (Dendrobatidae) y descripción del desarrollo embrionario de tres anuros con desarrollo directo: *Noblella* aff. *heyeri*, *Noblella* sp. (Craugastoridae) y *Osornophryne occidentalis* (Buffonidae). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado de http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/15833/20181109_Tesis_Leonardo_Negrete.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Noble, G. K. (1927). The value of life history data in the study of the evolution of the Amphibia. *Annals of the New York Academy of sciences*, *30*(1), 31-128.

Nokhbatolfoghahai, M., y Downie, J. R. (2008). The external gills of anuran amphibians: Comparative morphology and ultrastructure. *Journal of Morphology*, *269*(10), 1197-1213.

Nokhbatolfoghahai, M., Downie, J. R., y Atherton, L. (2013). External gill motility and striated muscle presence in the embryos of anuran amphibians. *Tissue and Cell*, *45*(1), 61-67.

Pinder, A. y Burggren, W. (1983). Respiration during chronic hypoxia and hyperoxia in larval and adult bullfrogs (*Rana catesbeiana*). II. Changes in respiratory properties of whole blood. *The Journal of experimental biology*, *105*, 205-13. Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6604782

Pinder, A. W., y Friet, S. C. (1994). Oxygen transport in egg masses of the amphibians *Rana sylvatica* and *Ambystoma maculatum* : convection , diffusion and oxygen production by algae, *30*, 17-30.

Polezhayev, L. W. (1946). The loss and restoration of regenerative capacity in the limbs of tailless amphibia. *Biological Reviews*, *21*(4), 141-147.

Procaccini, D., y Doyle, C. (1970). Streptomycin Induced Teratogenesis in Developing and Regenerating Amphibians. *Oncology*, *24*, 43.

Rogge, J. R., y Warkentin, K. M. (2008). External gills and adaptive embryo behavior facilitate synchronous development and hatching plasticity under respiratory constraint. *The Journal of experimental biology*, *211*(Pt 22), 3627-3635.

Rose, M. (1945). The effect of NaCl in stimulating regeneration of limbs of frogs. *The journal of Morphology*, *77*(2), 119-139.

Rugh, R. (1962). *Experimental embryology; techniques and procedures.* ([3d ed.].). Minneapolis,: Burgess Pub. Co.

Saito, N., Nishimura, K., Makanae, A. y Satoh, A. (2019). Fgf- and Bmp-signaling regulate gill regeneration in *Ambystoma mexicanum*. *Developmental Biology*.

Seymour, R. S. (1999). Respiration of aquatic and terrestrial amphibian embryos 1. *American Zoologist*, *39*(2), 261-270.

Summers, K., McKeon, C. S. y Heying, H. (2006). The evolution of parental care and egg size: A comparative analysis in frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *273*(1587), 687-692.

Touchon, J. y Warkentin, K. M.. (2008). Reproductive mode plasticity: aquatic and terrestrial oviposition in a treefrog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(21), 7495-7499.

Touchon, J., McCoy, M. W., Vonesh, J. R., y Warkentin, K. M. (2013). Effects of plastic hatching timing carry over through metamorphosis in red-eyed treefrogs. *Ecology, 94*(4), 850-860.

Uchiyama, M. y Yoshizawa, H. (1992). Salinity tolerance and structure of external and internal gills in tadpoles of the crab-eating frog, *Rana cancrivora*. *Cell & Tissue Research*, *267*(1), 35-44.

Warkentin, K. M.(1995). Adaptive plasticity in hatching age: a response to predation risk trade-offs. *Pnas*, *92*(8), 3507-3510.

Warkentin, K. M. (2000). Environmental and developmental effects on external gill loss in the red-eyed tree frog, *Agalychnis callidryas*. *Physiological and biochemical zoology : PBZ*, *73*(5), 557-65.

Warkentin, K. M. (2002). Hatching timing, oxygen availability, and external gill regression in the tree frog, *Agalychnis callidryas*. *Physiological and biochemical zoology : PBZ*, *75*(2), 155-164.

Warkentin, K. M., Gomez-Mestre, I. y Mcdaniel, J. G.. (2005). Development, surface exposure, and embryo behavior affect oxygen levels in eggs of the red-eyed treefrog, *Agalychnis callidryas*. *Physiological and Biochemical Zoology*, *78*(6), 956-966.

Warkentin, K. M. (2007). Oxygen, gills, and embryo behavior: mechanisms of adaptive plasticity in hatching. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *148*(4), 720-731.

West, N. y Burggren, W. W. (1982). Tadpole, Gill and lung ventilatory responses to steady-state aquatic hypoxia and hyperoxia in the bullfrog. *Respiration Physiology*, *47*(11), 165-176.

Weygoldt, P. (1987). Evolution of parental care in dart poison frogs (Amphibia: Anura: Dendrobatidae). *Zeit Fur Zool Syst Evol Forschung*, *25*(May 1986), 51-67.

9. FIGURAS

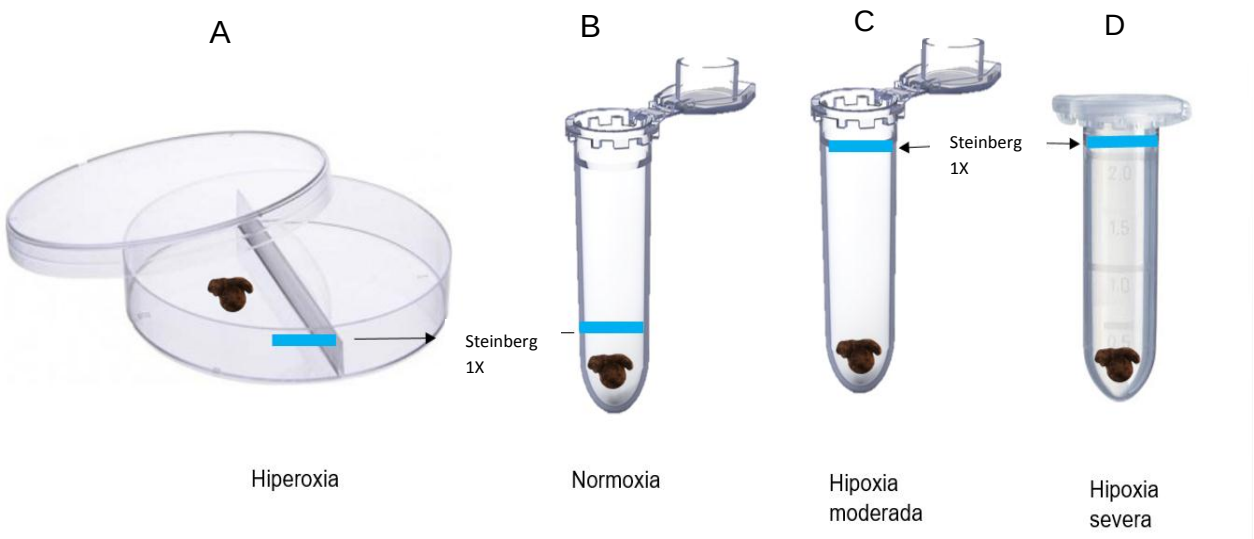


FIGURA 1. Esquema gráfico de los tratamientos. Este modelo de variación de oxígeno presente en la solución salina de Steinberg 1X según la altura de la columna de líquido fue aplicado para embriones con branquias y embriones con branquias que fueron amputadas. En Hiperoxia la solución se colocó en la mitad de una caja Petri plástica con división hasta 1.5 cm y se la oxigenó ocasionalmente con aereador de peceras. En Normoxia la solución se colocó en el tubo de 2ml hasta una altura de 0.5 ml y se dejó la tapa abierta simulando las condiciones del embrión dentro de la gelatina. En hipoxia moderada se colocó Steinberg 1X hasta los 2ml de altura en el tubo de 2ml y se dejó la tapa abierta. En hipoxia moderada se colocó la solución hasta los 2ml igualmente pero se cerró la tapa y para evitar cualquier ingreso de oxígeno se selló con parafilm.

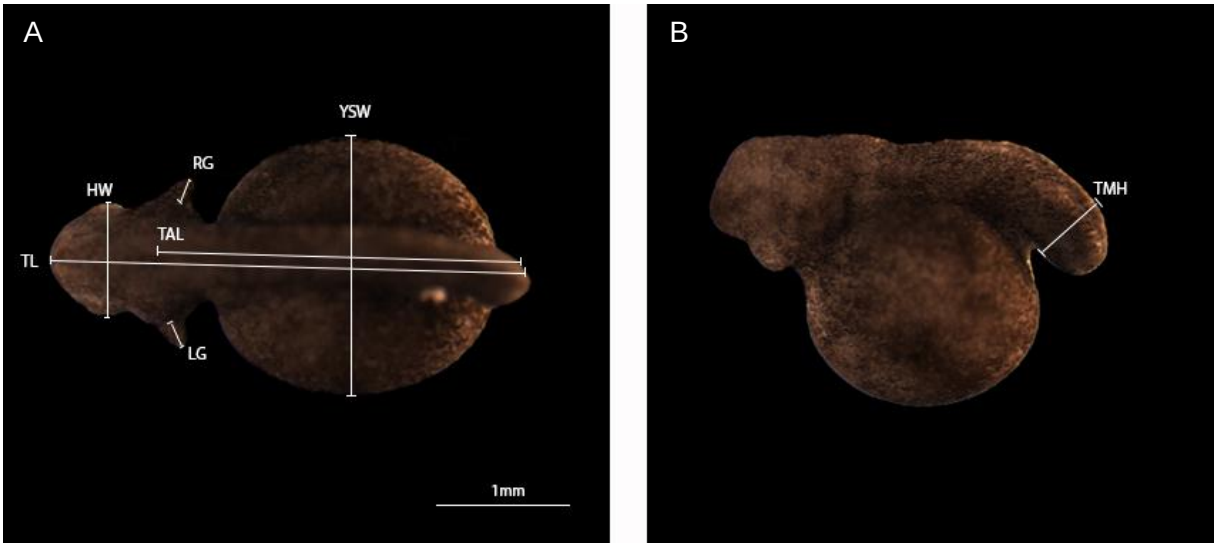


FIGURA 2. Embrión de *Hyloxalus awa* en estadio 19, vista dorsal (A) y lateral (B) con las medidas que se tomaron. Las medidas que fueron tomadas son: Largo total: desde la punta de la cabeza a la punta de la cola (TL), Largo del cuerpo y la cola: a la altura de las yemas de las branquias hasta la punta de la cola (TAL), Ancho del saco de yema: en el ecuador de la yema del extremo izquierdo al derecho (YSW), Ancho de la cabeza: pasando por la parte más ancha de la cabeza, en el sitio en donde se formarán los ojos (HW), Alto de la musculatura en la cola: en la parte más ancha de la cola (TMH), Largo de la yema derecha (RG), Largo de la yema izquierda (LG): medida total de la yema de la branquia, desde la raíz hasta la punta. En caso de ser embriones “Gills cut”, se toma la medida de cualquier remanente de piel que quedó después de la amputación.

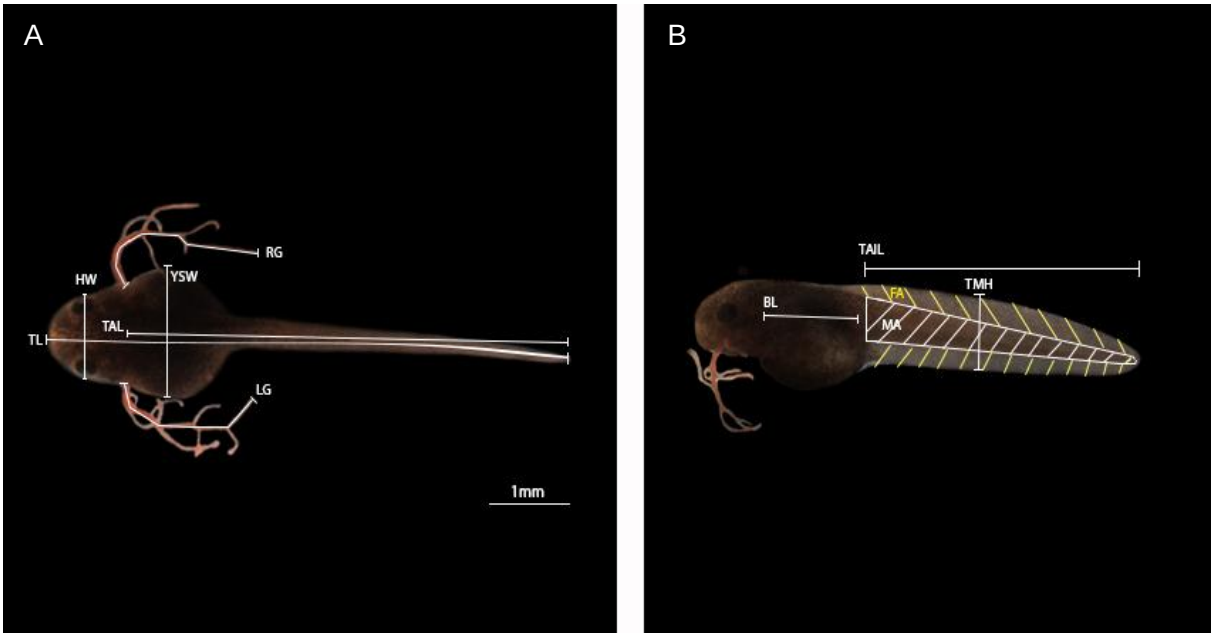
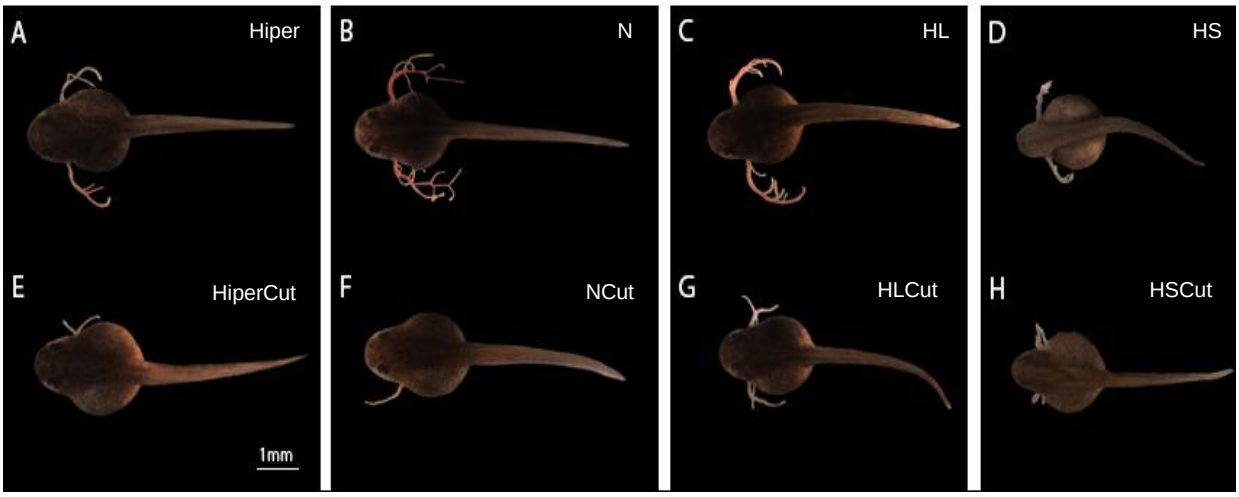
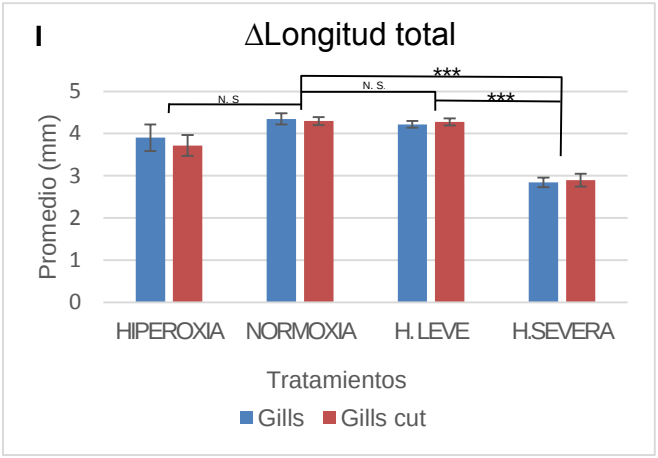
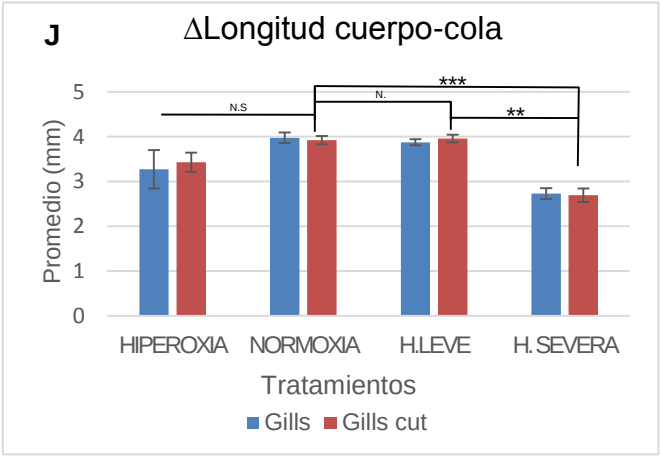


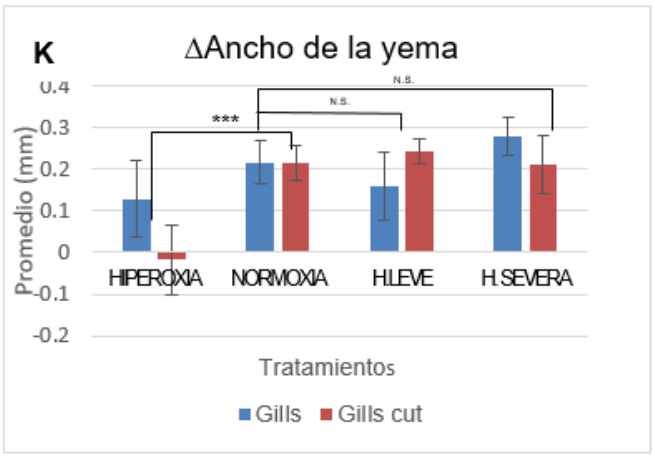
FIGURA 3. Embrión de *Hyloxalus awa* en estadio 23, vista dorsal (A) y lateral (B) con las medidas que se tomaron. Las medidas que fueron tomadas son: Largo total: desde la punta de la cabeza a la punta de la cola (TL), Largo del cuerpo y la cola: por debajo del opérculo hasta la punta de la cola (TAL), Ancho del saco de yema: en el ecuador de la yema del extremo izquierdo al derecho (YSW), Ancho de la cabeza: pasando por la mitad de los ojos del extremo izquierdo al derecho de la cabeza (HW), Largo de la branquia derecha (RG), Largo de la branquia izquierda (LG): tomando la medida de la rama principal de la branquia hasta el punto más lejano, Alto de la musculatura en la cola: en la parte más ancha de la cola (TMH) Largo de la cola (TAIL), largo del cuerpo (BL), área de la musculatura de la cola (MA) y área de la aleta de la cola (FA).

FIGURA 4.


A
Hiper
B
N
C
HL
D
HS
E
HiperCut
F
NCut
G
HLCut
H
HSCut
1mm


I
ΔLongitud total
Promedio (mm)
0
1
2
3
4
5
N. S.
N. S.
***
***
HIPEROXIA
NORMOXIA
H. LEVE
H.SEVERA
Tratamientos
Gills
Gills cut


J
ΔLongitud cuerpo-cola
Promedio (mm)
0
1
2
3
4
5
N.S
N.
***
**
HIPEROXIA
NORMOXIA
H.LEVE
H. SEVERA
Tratamientos
Gills
Gills cut


K
ΔAncho de la yema
Promedio (mm)
-0.2
-0.1
0
0.1
0.2
0.3
0.4
N.S.
N.S.
***
HIPEROXIA
NORMOXIA
H.LEVE
H.SEVERA
Tratamientos
Gills
Gills cut

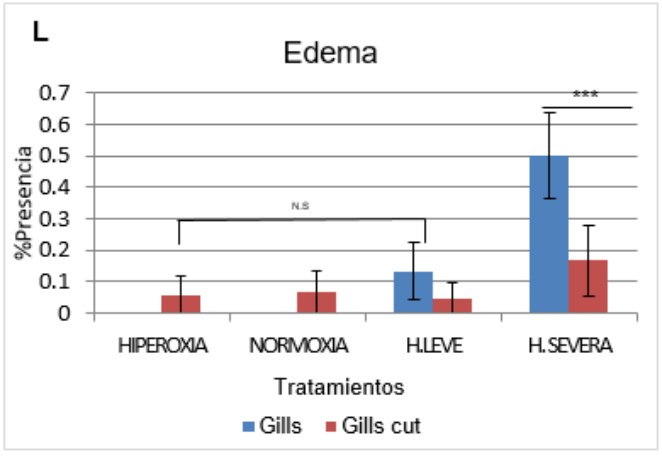
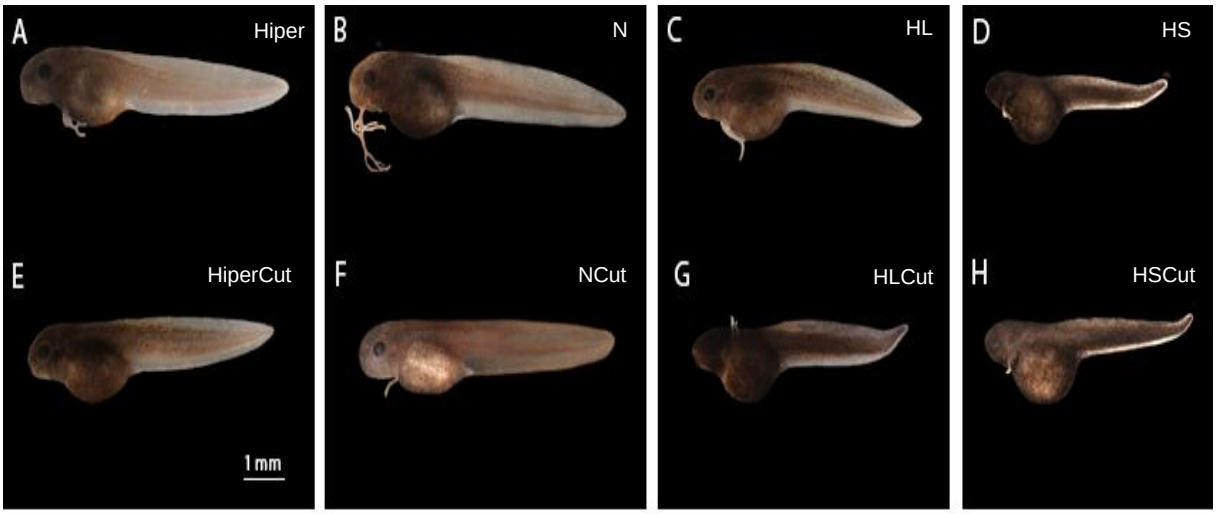
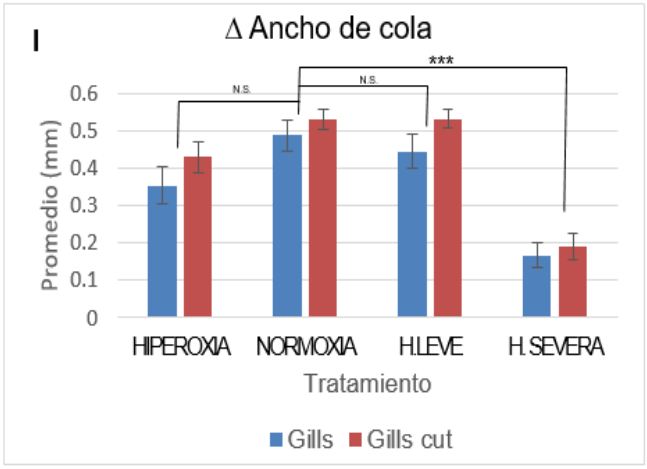
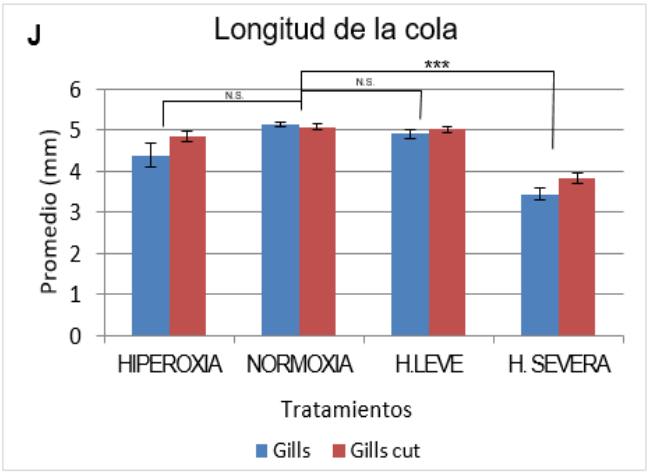

L
Edema
%Presencia
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
N.S
***
HIPEROXIA
NORMOXIA
H.LEVE
H.SEVERA
Tratamientos
Gills
Gills cut

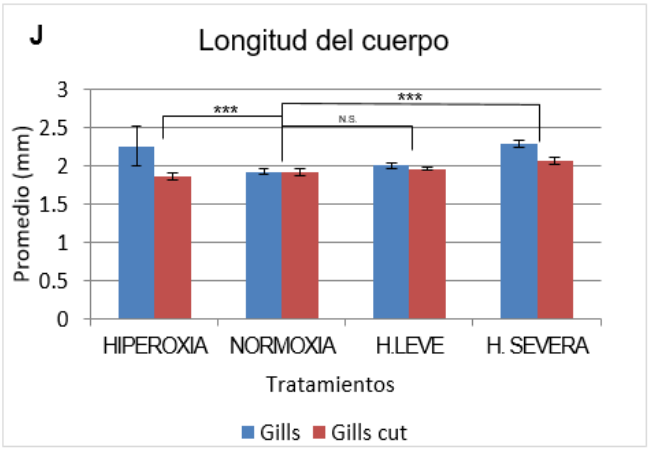
FIGURA 4. Efecto de los tratamientos sobre la longitud total, la longitud cuerpo-cola, ancho de la yema y formación de edemas en *Hyloxalus awa* en estadio 23. Fotos A- D muestran los embriones Gills. Fotos E-H muestran los embriones Gills cut. A y E son los embriones sometidos a hiperoxia (Hiper), B y F pertenecen al tratamiento de normoxia (N), C y G al tratamiento hipoxia leve (HL), D y H a hipoxia severa (HS). Los gráficos I-L muestran la significancia del efecto de cada tratamiento sobre una medida morfológica específica según los estadísticos realizados (Anexos).

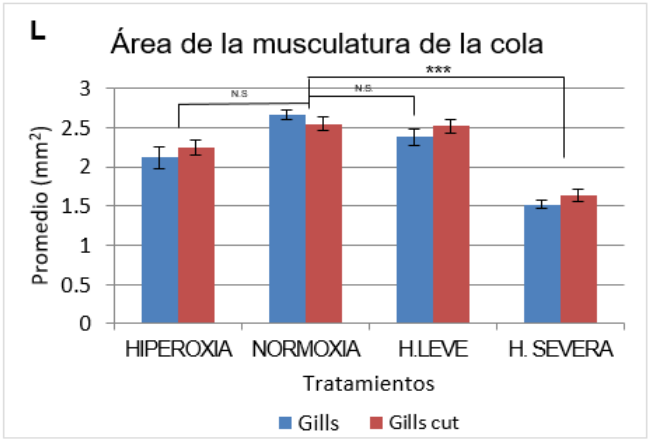
FIGURA 5.

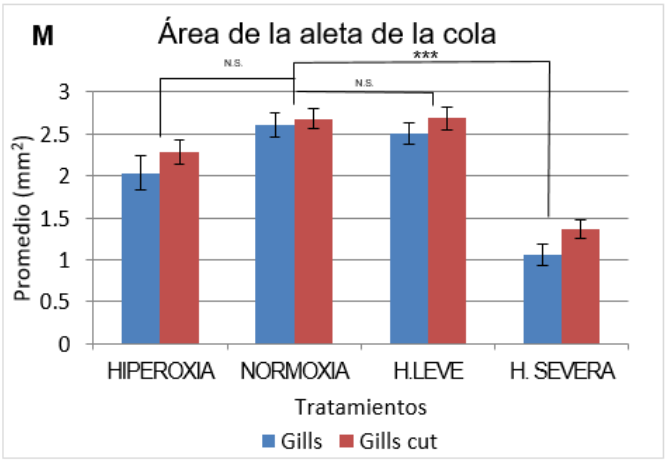

A
Hiper
B
N
C
HL
D
HS
E
HiperCut
F
NCut
G
HLCut
H
HSCut
1 mm

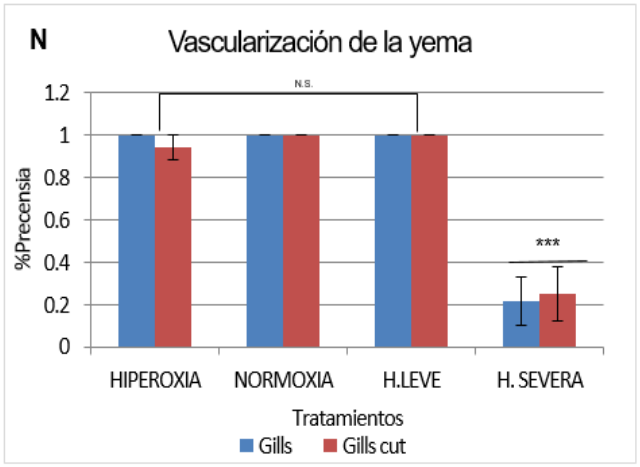

I
Δ Ancho de cola
Promedio (mm)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
N.S.
N.S.
***
HIPEROXIA
NORMOXIA
H.LEVE
H. SEVERA
Tratamiento
Gills
Gills cut


J
Longitud de la cola
Promedio (mm)
6
5
4
3
2
1
0
N.S.
N.S.
***
HIPEROXIA
NORMOXIA
H.LEVE
H. SEVERA
Tratamientos
Gills
Gills cut


J
Longitud del cuerpo
Promedio (mm)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
***
N.S.
***
HIPEROXIA
NORMOXIA
H.LEVE
H. SEVERA
Tratamientos
Gills
Gills cut


L
Área de la musculatura de la cola
Promedio (mm²)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
N.S.
N.S.
***
HIPEROXIA
NORMOXIA
H.LEVE
H. SEVERA
Tratamientos
Gills
Gills cut





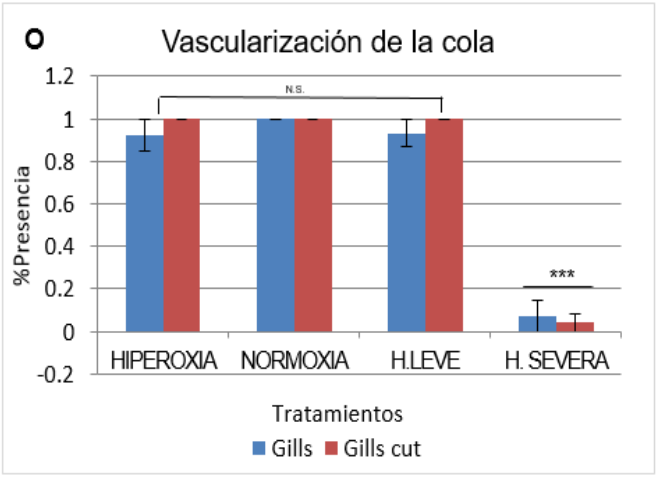
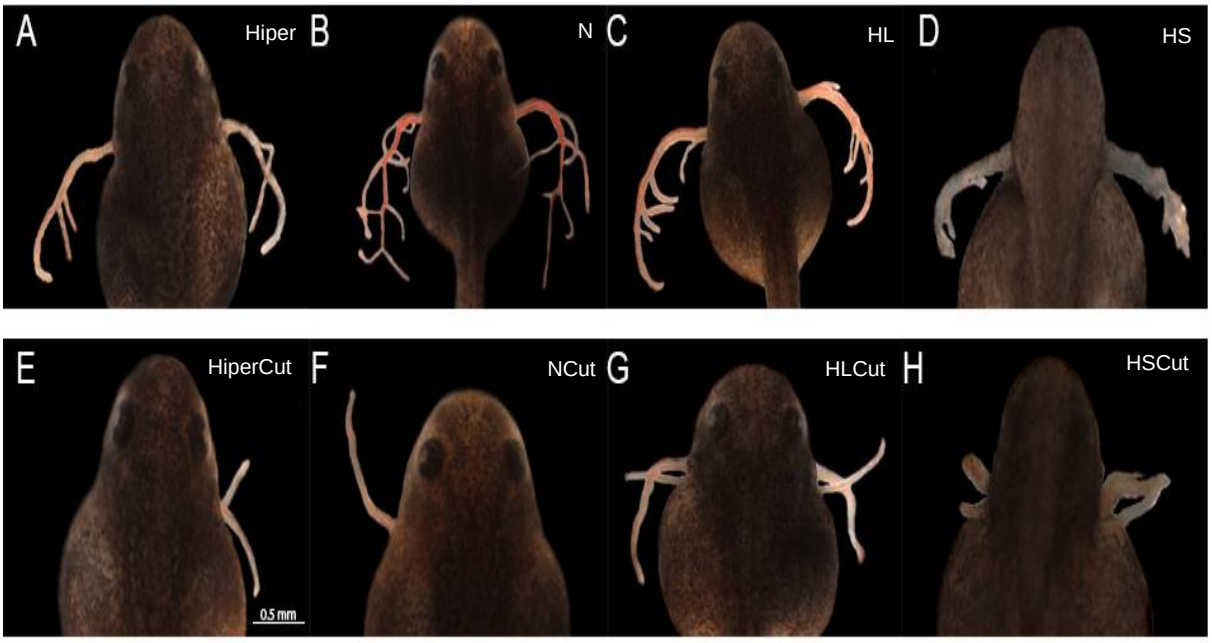
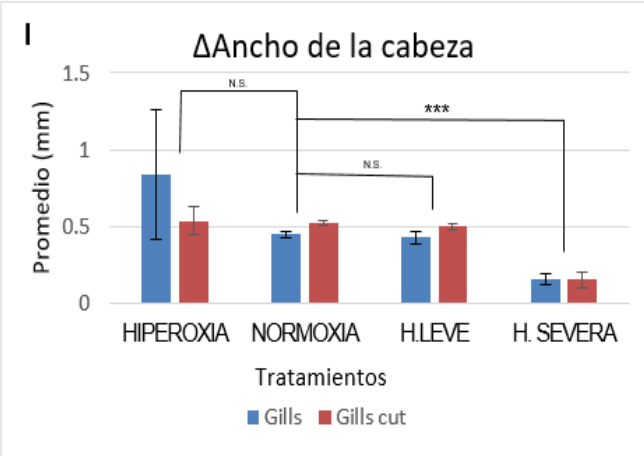
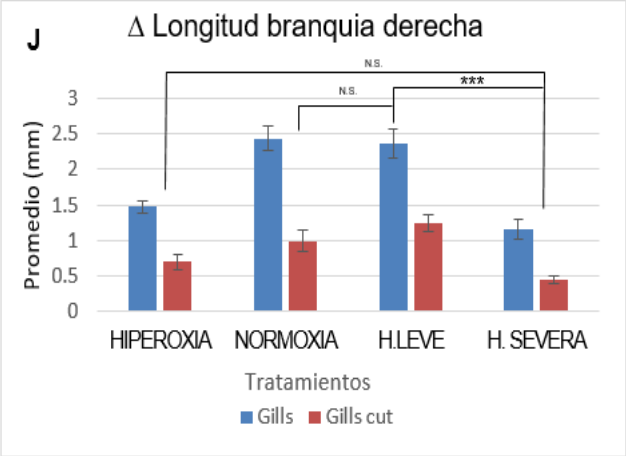


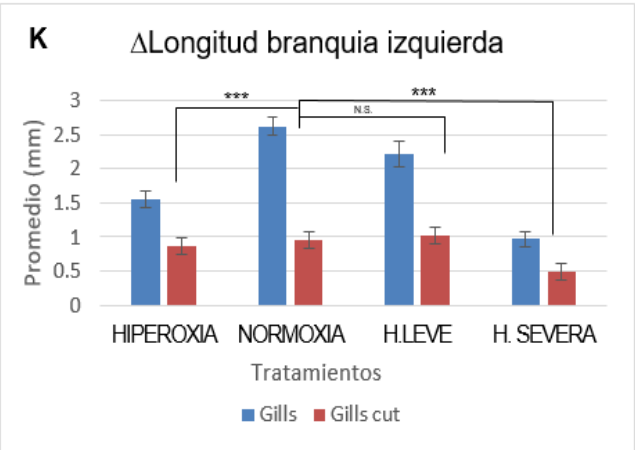
FIGURA 5. Efecto de los tratamientos sobre el ancho de la cola, la longitud de la cola, longitud del cuerpo, área de la musculatura de la cola, área de la aleta de la cola, vascularización de la yema y vascularización de la cola en *Hyloxalus awa* en estadio 23. Fotos A- D muestran los embriones Gills. Fotos E-H muestran los embriones Gills cut. A y E son los embriones sometidos a hiperoxia (Hiper), B y F pertenecen al tratamiento de normoxia (N), C y G al tratamiento hipoxia leve (HL), D y H a hipoxia severa (HS). Los gráficos I-O muestran la significancia del efecto de cada tratamiento sobre una medida morfológica específica según los estadísticos realizados (Anexos).

FIGURA 6.


A
Hiper
B
N
C
HL
D
HS
E
HiperCut
F
NCut
G
HLCut
H
HSCut
0.5 mm


I
ΔAncho de la cabeza
Promedio (mm)
1.5
1
0.5
0
N.S.
***
N.S.
HIPEROXIA
NORMOXIA
H.LEVE
H. SEVERA
Tratamientos
Gills
Gills cut


J
Δ Longitud branquia derecha
Promedio (mm)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
N.S.
N.S.
***
HIPEROXIA
NORMOXIA
H.LEVE
H. SEVERA
Tratamientos
Gills
Gills cut


K
ΔLongitud branquia izquierda
Promedio (mm)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
***
N.S.
***
HIPEROXIA
NORMOXIA
H.LEVE
H. SEVERA
Tratamientos
Gills
Gills cut

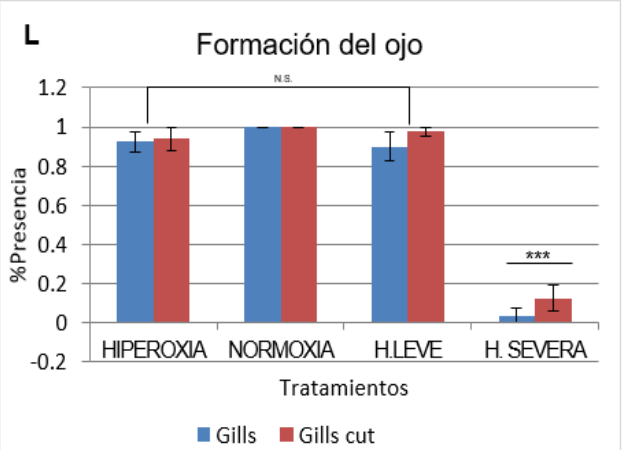

L
Formación del ojo
%Presencia
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
N.S.
***
HIPEROXIA
NORMOXIA
H.LEVE
H. SEVERA
Tratamientos
Gills
Gills cut

FIGURA 6. Efecto de los tratamientos sobre el ancho de la cabeza, longitud fr la branquia derecha, longitud de la branquia izquierda y formación del ojo en *Hyloxalus awa* en estadio 23. Fotos A- D muestran los embriones Gills. Fotos E-H muestran los embriones Gills cut. A y E son los embriones sometidos a hiperoxia (Hiper), B y F pertenecen al tratamiento de normoxia (N), C y G al tratamiento hipoxia leve (HL), D y H a hipoxia severa (HS). Los gráficos I-L muestran la significancia del efecto de cada tratamiento sobre una medida morfológica específica según los estadísticos realizados (Anexos).

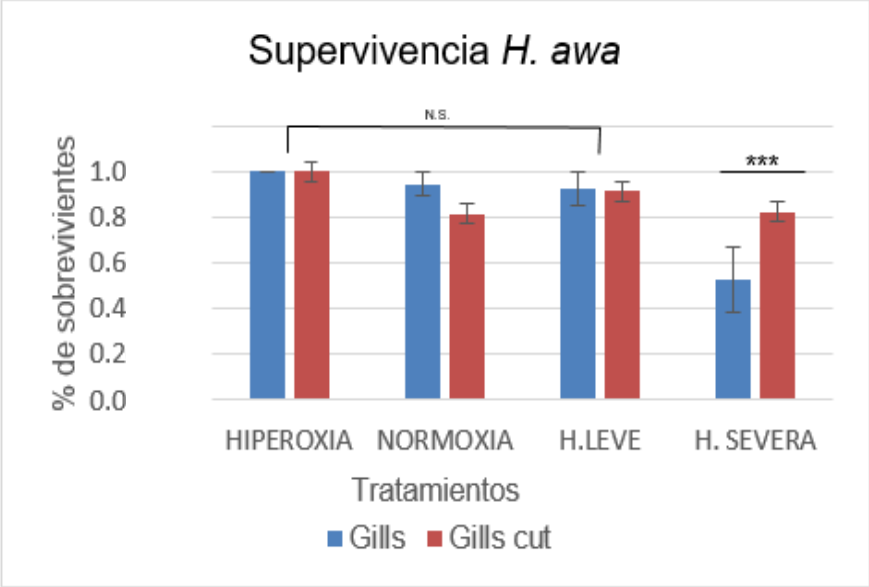


FIGURA 7: Supervivencia de *Hyloxalus awa*. Porcentaje de sobrevivientes según los diferentes tratamientos mostrando la significancia de cada uno según los estadísticos realizados

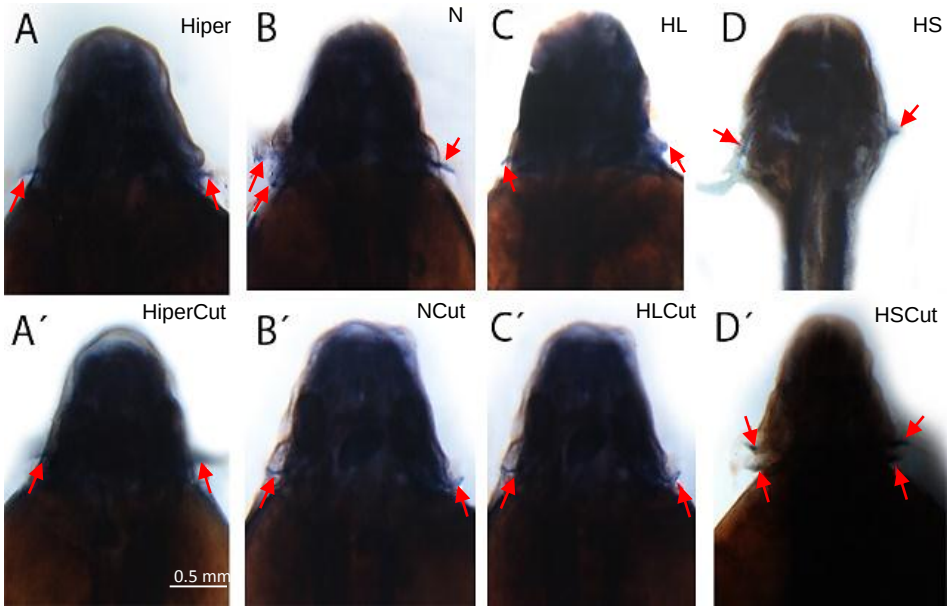


FIGURA 8: Inmunotinción en montaje entero con el anticuerpo primario MF20 (expresión de miosina) y el anticuerpo secundario anti mouse-IgG acoplado a la fosfatasa alcalina en embriones de *Hyloxalus awa* en estadio 23. A, B, C y D son embriones cuyas branquias no fueron cortadas y pertenecen a los tratamientos de hiperoxia, normoxia, hipoxia moderada, hipoxia severa respectivamente. A´, B´, C´ y D´ son embriones cuyas branquias fueron extirpadas mecánicamente y de igual forma pertenecen a hiperoxia, normoxia, hipoxia moderada e hipoxia severa en el mismo orden. En las imágenes podemos observar flechas rojas que señalan la raíz de las branquias las cuales fueron teñidas de azul mientras que el resto de la branquia no presenta color. Todas las branquias, ya sean intactas o regeneradas presentaron la tinción azul en la raíz de la branquia.

10. TABLAS

Tabla 1. Promedio, desviación estándar y error de la medición morfológica de la Longitud Total en *Hyloxalus awa*

	LONGITUD TOTAL							
	GILLS				GILLS CUT			
GILLS	HIPEROXIA	NORMOXIA	H. LEVE	H.SEVERA	HIPEROXIA	NORMOXIA	H.LEVE	H. SEVERA
Promedio	3.9026554	4.34464	4.2170587	2.8456857	3.718157	4.295676	4.275752	2.894587
STDV	1.1322164	0.419058	0.3051528	0.4296807	1.01274	0.369347	0.381721	0.525384
ERROR ST	0.3140203	0.1325178	0.0787901	0.114837	0.245626	0.095365	0.083298	0.151665

Tabla 2. Promedio, desviación estándar y error de la medición morfológica de la Longitud cuerpo-cola en *Hyloxalus awa*

	LONGITUD CUERPO-COLA							
	GILLS				GILLS CUT			
	HIPEROXIA	NORMOXIA	H.LEVE	H. SEVERA	HIPEROXIA	NORMOXIA	H.LEVE	H. SEVERA
Promedio	3.2746769	3.976	3.8760027	2.7313214	3.428329	3.922517	3.958845	2.694275
STDV	1.5484813	0.3661952	0.2631375	0.4505419	0.881563	0.358125	0.404253	0.51183
ERROR ST	0.4294714	0.1158011	0.0679418	0.1204124	0.21381	0.092468	0.088215	0.147753

Tabla 3. Promedio, desviación estándar y error de la medición morfológica del Ancho de la yema en *Hyloxalus awa*

	ANCHO DE LA YEMA							
	GILLS				GILLS-CUT			
	HIPEROXIA	NORMOXIA	H.LEVE	H. SEVERA	HIPEROXIA	NORMOXIA	H.LEVE	H. SEVERA
Promedio	0.12888462	0.21637	0.1592533	0.2781836	-0.0177353	0.21637067	0.243357	0.210458
STDV	0.32674725	0.1617773	0.3238644	0.1742005	0.34678534	0.16147661	0.137999	0.240939
ERROR ST	0.09062338	0.0511585	0.0836214	0.0465571	0.0841078	0.04169308	0.030114	0.069553

Tabla 4. Promedio, desviación estándar y error de la medición morfológica de la Branquia derecha en *Hyloxalus awa*

	BRANQUIA DERECHA							
	GILLS				GILLS-CUT			
	HIPEROXIA	NORMOXIA	H.LEVE	H. SEVERA	HIPEROXIA	NORMOXIA	H.LEVE	H. SEVERA
promedio	1.4705254	2.434333	2.3582233	1.1608143	0.695438	0.992567	1.2358	0.445181
STDV	0.3396161	0.5420947	0.772576	0.5208692	0.432795	0.614313	0.546577	0.176417
ERROR ST	0.0941926	0.1714254	0.1994783	0.1392081	0.104968	0.158615	0.119273	0.050927

Tabla 5. Promedio, desviación estándar y error de la medición morfológica de la Branquia izquierda en *Hyloxalus awa*

	BRANQUIA IZQUIERDA							
	GILLS				GILLS-CUT			
	HIPEROXIA	NORMOXIA	H.LEVE	H. SEVERA	HIPEROXIA	NORMOXIA	H.LEVE	H. SEVERA
Promedio	1.4705254	2.434333	2.3582233	1.1608143	0.695438	0.992567	1.2358	0.445181
STDV	0.3396161	0.5420947	0.772576	0.5208692	0.432795	0.614313	0.546577	0.176417
ERROR ST	0.0941926	0.1714254	0.1994783	0.1392081	0.104968	0.158615	0.119273	0.050927

Tabla 6. Promedio, desviación estándar y error de la medición morfológica del Ancho de la musculatura de la cola en *Hyloxalus awa*

	ANCHO DE LA MUSCULATURA DE LA COLA							
	GILLS				GILLS-CUT			
	HIPEROXIA	NORMOXIA	H.LEVE	H. SEVERA	HIPEROXIA	NORMOXIA	H.LEVE	H. SEVERA
Promedio	0.3532692	0.48871	0.4460667	0.16655	0.430446	0.531379	0.533499	0.192033
STDV	0.1800387	0.1353447	0.1790583	0.1250911	0.165925	0.102742	0.112634	0.121439
ERROR ST	0.0499338	0.0427998	0.0462327	0.033432	0.040243	0.026528	0.024579	0.035056

Tabla 7. Promedio, desviación estándar y error calculado a partir de las mediciones morfológicas Longitud de la cola, Longitud del cuerpo, Área de la musculatura de la cola y Área de la aleta de la cola de *Hyloxalus awa* del día final bajo los distintos tratamientos.

	Longitud de la cola							
	GILLS				**GILLS CUT**			
	HIPEROXIA	**NORMOXIA**	**H.LEVE**	**H. SEVERA**	**HIPEROXIA**	**NORMOXIA**	**H.LEVE**	**H. SEVERA**
promedio	4.3847408	5.122226	4.9020627	3.4391196	4.844088	5.06633	5.011483	3.814474
STDV	1.0881618	0.1616172	0.4204695	0.5052805	0.53006	0.290186	0.330422	0.458679
ERROR ST	0.3018018	0.0511078	0.1085648	0.1350419	0.128558	0.074926	0.072104	0.132409
	Longitud del cuerpo							
	GILLS				**GILLS CUT**			
promedio	2.2586423	1.9278	2.0099447	2.2961507	1.866235	1.929643	1.965648	2.066463
STDV	0.9380231	0.1205554	0.1413786	0.1903109	0.172722	0.181721	0.102644	0.164504
ERROR ST	0.2601608	0.038123	0.0365038	0.0508627	0.041891	0.04692	0.022399	0.047488
	Área de la aleta de la cola							
	GILLS				**GILLS CUT**			
promedio	2.1172539	2.656833	2.3747773	1.5188836	2.244276	2.548861	2.5143	1.626744
STDV	0.5056155	0.1992574	0.4081795	0.1763355	0.403664	0.322198	0.362454	0.26581
ERROR ST	0.1402325	0.0630107	0.1053915	0.0471276	0.097903	0.083191	0.079094	0.076733
	Área de la aleta de la cola							
	GILLS				**GILLS CUT**			
promedio	2.0335908	2.6034944	2.50504	1.0648014	2.282639	2.684705	2.689649	1.367008
STDV	0.7281571	0.4521077	0.5180614	0.4673303	0.586052	0.451193	0.623669	0.396662
ERROR ST	0.2019544	0.142969	0.1337629	0.1248993	0.142138	0.116498	0.136096	0.114506

Tabla 8. Promedio, desviación estándar y error calculado a partir de las medidas de Presencia/Ausencia de Vascularización de la yema, formación de edema, vascularización de la cola y formación del ojo en *Hyloxalus awa* del día final bajo los distintos tratamientos.

	Vascularización de la yema							
	GILLS				**GILLS CUT**			
	HIPEROXIA	**NORMOXIA**	**H.LEVE**	**H. SEVERA**	**HIPEROXIA**	**NORMOXIA**	**H.LEVE**	**H. SEVERA**
promedio	1	1	1	0.2142857	0.941176	1	1	0.25
STDV	0	0	0	0.4258153	0.242536	0	0	0.452267
ERROR ST	0	0	0	0.1138039	0.058824	0	0	0.130558
	Edema							
	GILLS				**GILLS CUT**			
promedio	0	0	0.1333333	0.5	0.058824	0.066667	0.047619	0.166667
STDV	0	0	0.3518658	0.5188745	0.242536	0.258199	0.218218	0.389249
ERROR ST	0	0	0.0908514	0.138675	0.058824	0.066667	0.047619	0.112367
	Vascularización de la cola							
	GILLS				**GILLS CUT**			
promedio	0.9230769	1	0.9333333	0.0714286	1	1	1	0.041667
STDV	0.2773501	0	0.2581989	0.2672612	0	0	0	0.144338
ERROR ST	0.0769231	0	0.0666667	0.0714286	0	0	0	0.041667
	Formación del ojo							
	GILLS				**GILLS CUT**			
promedio	0.9230769	1	0.9	0.0357143	0.941176	1	0.97619	0.125
STDV	0.1877669	0	0.280306	0.1336306	0.242536	0	0.109109	0.226134
ERROR ST	0.0520772	0	0.0723747	0.0357143	0.058824	0	0.02381	0.065279

Tabla 9: Tabla de contingencia de la presencia de la formación del cristalino en los embriones de *H. awa* según cada tratamiento aplicado.

FORMACIÓN DEL OJO						
	GILLS			GILLS CUT		
	SÍ	NO	INCOMPLETO	SÍ	NO	INCOMPLETO
Hiperoxia	10	0	2	16	1	0
Normoxia	10	0	0	15	0	0
H. Moderada	13	1	1	20	0	1
H. Severa	0	13	1	0	9	3

Tabla 10. Tabla de contingencia de la presencia de vascularización de la yema en los embriones de *H. awa* según cada tratamiento aplicado.

VASCULARIZACIÓN DE LA YEMA						
	GILLS			GILLS CUT		
	SÍ	NO	INCOMPLETO	SÍ	NO	INCOMPLETO
Hiperoxia	13	0	0	16	1	0
Normoxia	10	0	0	15	0	0
H. Moderada	15	0	0	21	0	0
H. Severa	0	13	1	3	9	0

Tabla 11. Tabla de contingencia de la presencia de la formación de edema en los embriones de *H. awa* según cada tratamiento aplicado.

FORMACIÓN DE EDEMA						
	GILLS			GILLS CUT		
	SÍ	NO	INCOMPLETO	SÍ	NO	INCOMPLETO
Hiperoxia	0	13	0	1	16	0
Normoxia	0	10	0	1	14	0
H. Moderada	2	13	0	1	20	0
H. Severa	7	7	0	2	10	0

Tabla 12. Tabla de contingencia de la presencia de vascularización de la cola en los embriones de *H. awa* según cada tratamiento aplicado.

VASCULARIZACIÓN DE LA COLA						
	GILLS			GILLS CUT		
	SÍ	NO	INCOMPLETO	SÍ	NO	INCOMPLETO
Hiperoxia	12	1	0	17	0	0
Normoxia	10	0	0	15	0	0
H. Moderada	14	1	0	21	0	0
H. Severa	1	13	0	11	0	1

Tabla 13. Supervivencia de los embriones de *Hyloxalus awa*

	Supervivencia (último día)							
	HSCut	**HLCut**	**NCut**	**HiperCut**	**HS**	**HL**	**N**	**Hiper**
	2	2	2	2	2	2	2	2
	1	1	3	4	3	2	1	4
	1	2	1	1	2	1	1	1
	2	2	2	2	2	2	2	2
	0	1	1	1	1	1	1	1
	0	2	1	1	1	1	1	1
	0	2	2	2	0	1	0	1
	2	4		1	1	3		1
	3	2	2	2	1	1	1	
	1	2	1	1	1	1	1	1
Promedio	0.525	0.925	0.944444	1	0.825	0.916667	0.814815	1
STDV	0.447989	0.237171	0.166667	0	0.334373	0.180021	0.376796	0
ERROR ST	0.141667	0.075	0.052705	0	0.105738	0.056928	0.119153	0

11. ANEXOS

Anexo 1. Prueba no paramétrica utilizada para un diseño factorial de dos vías de Scheirer-Ray-Hare para las medidas de Largo total (TL).

DV: TL
Observations: 117
D: 1
MS total: 1150.5

	Df	Sum Sq	H	p.value
tratamientos	3	57244	49.756	0.00000
corte	1	241	0.210	0.64707
tratamientos:corte	3	788	0.685	0.87664
Residuals	109	75184		

Anexo 2. Prueba de comparación múltiple de Dunn para las medidas de Largo total (TL).

	Comparison	Z	P.unadj	P.adj
1	Hiperoxia - Moderada	-1.3456559	1.784135e-01	3.568270e-01
2	Hiperoxia - Normoxia	-1.7165081	8.606908e-02	2.582073e-01
3	Moderada - Normoxia	-0.5077081	6.116581e-01	6.116581e-01
4	Hiperoxia - Severa	4.6909334	2.719615e-06	1.087846e-05
5	Moderada - Severa	6.1762064	6.566013e-10	3.939608e-09
6	Normoxia - Severa	6.1466874	7.911784e-10	3.955892e-09

Anexo 3. Prueba no paramétrica utilizada para un diseño factorial de dos vías de Scheirer-Ray-Hare para las medidas de Largo cuerpo-cola (TAL).

DV: TAL
Observations: 117
D: 1
MS total: 1150.5

	Df	Sum Sq	H	p.value
tratamientos	3	53555	46.549	0.00000
corte	1	141	0.123	0.72585
tratamientos:corte	3	559	0.486	0.92202
Residuals	109	79203		

Anexo 4. Prueba de comparación múltiple de Dunn para las medidas de Largo cuerpo-cola (TAL).

	Comparison	Z	P.unadj	P.adj
1	Hiperoxia - Moderada	-1.7981832	7.214798e-02	1.442960e-01
2	Hiperoxia - Normoxia	-1.8065069	7.083920e-02	2.125176e-01
3	Moderada - Normoxia	-0.1716267	8.637310e-01	8.637310e-01
4	Hiperoxia - Severa	4.2341690	2.293984e-05	9.175935e-05
5	Moderada - Severa	6.1353303	8.498242e-10	5.098945e-09
6	Normoxia - Severa	5.7967666	6.760566e-09	3.380283e-08

Anexo 5. Prueba no paramétrica utilizada para un diseño factorial de dos vías de Scheirer-Ray-Hare para las medidas del ancho de la yema (YSW).

DV: YSW
Observations: 117
D: 0.9999963
MS total: 1150.5

	Df	Sum Sq	H	p.value
tratamientos	3	7342	6.3812	0.09447
corte	1	1861	1.6173	0.20346
tratamientos:corte	3	2783	2.4192	0.49008
Residuals	109	121472		

Anexo 6. Prueba de comparación múltiple de Dunn para las medidas del ancho de la yema (YSW).

	Comparison	Z	P.unadj	P.adj
1	Hiperoxia - Moderada	-1.94361839	0.05194149	0.2597074
2	Hiperoxia - Normoxia	-1.75897049	0.07858252	0.3143301
3	Moderada - Normoxia	0.01591702	0.98730059	0.9873006
4	Hiperoxia - Severa	-2.30230551	0.02131795	0.1279077
5	Moderada - Severa	-0.53004399	0.59608143	1.0000000
6	Normoxia - Severa	-0.50180769	0.61580280	1.0000000

Anexo 7. Prueba no paramétrica utilizada para un diseño factorial de dos vías de Scheirer-Ray-Hare para las medidas del ancho de la cabeza (HW).

DV: HW
Observations: 117
D: 1
MS total: 1150.5

	Df	Sum Sq	H	p.value
tratamientos	3	57563	50.033	0.00000
corte	1	3217	2.796	0.09448
tratamientos:corte	3	1887	1.641	0.65022
Residuals	109	70790		

Anexo 8. Prueba de comparación múltiple de Dunn para las medidas del ancho de la cabeza (HW).

	Comparison	Z	P.unadj	P.adj
1	Hiperoxia - Moderada	-0.4551775	6.489815e-01	1.000000e+00
2	Hiperoxia - Normoxia	-0.7323284	4.639681e-01	1.000000e+00
3	Moderada - Normoxia	-0.3295384	7.417488e-01	7.417488e-01
4	Hiperoxia - Severa	5.4687588	4.531979e-08	1.812792e-07
5	Moderada - Severa	6.1306798	8.750439e-10	5.250263e-09
6	Normoxia - Severa	5.9392610	2.863098e-09	1.431549e-08

Anexo 9. ANOVA de la branquia derecha (RG)

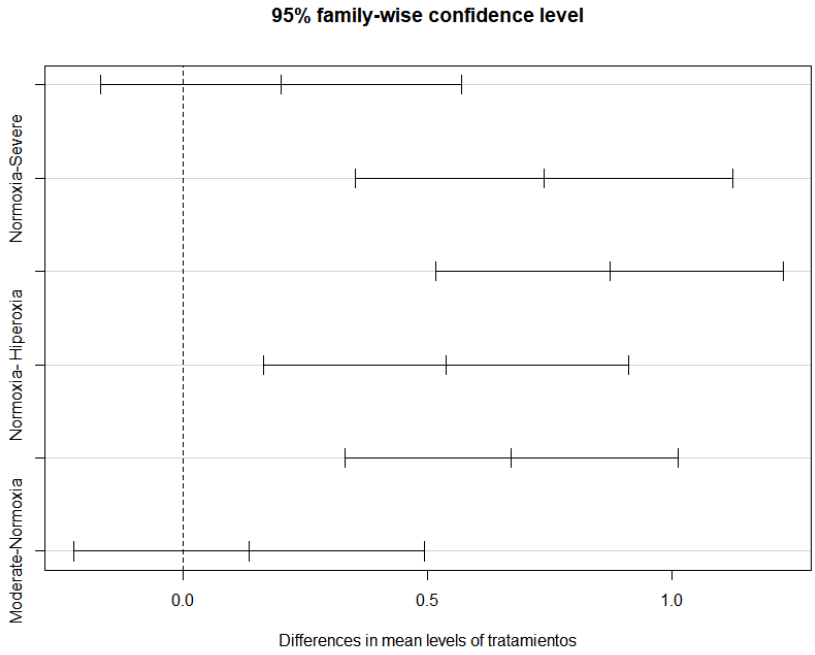
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
tratamientos	3	15.561	5.187	18.532	8.72e-10	***
corte	1	29.035	29.035	103.732	< 2e-16	***
tratamientos:corte	3	2.195	0.732	2.614	0.0548	.
Residuals	109	30.510	0.280			

Signif. codes: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

Anexo 10. Test de normalidad de Shapiro-Wilk de la branquia derecha (RG)

data: residualesrg
W = 0.98612, p-value = 0.2746

Anexo 11. Prueba Post-Hoc de Tuckey de la branquia derecha (RG)



Anexo 12. ANOVA de la branquia izquierda (LG)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
tratamientos	3	12.735	4.245	15.041	2.93e-08	***
corte	1	28.085	28.085	99.509	< 2e-16	***
tratamientos:corte	3	5.358	1.786	6.328	0.000537	***
Residuals	109	30.764	0.282			

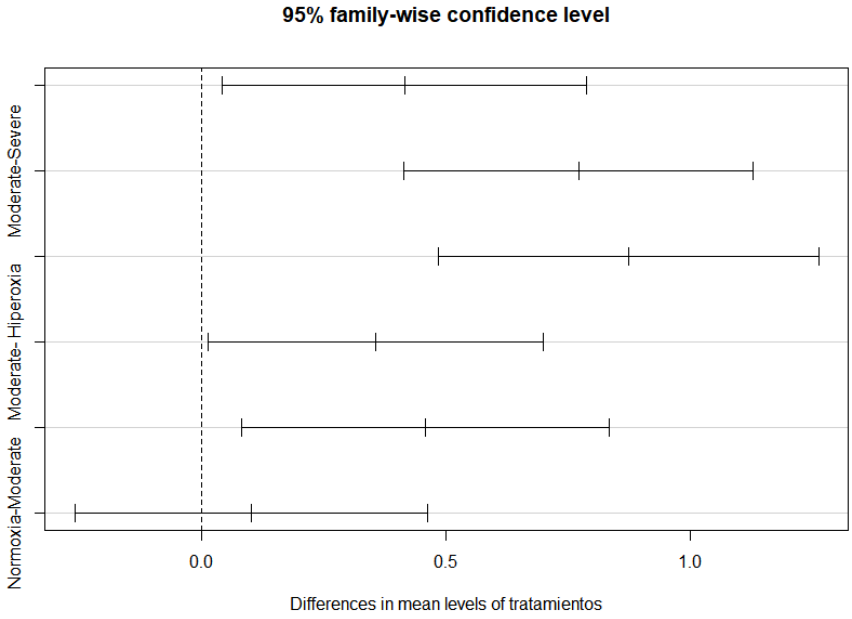
Signif. codes: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

Anexo 13. Test de normalidad de Shapiro-Wilk de la branquia izquierda (LG)

Shapiro-Wilk normality test

data: residualeslg
W = 0.99157, p-value = 0.697

Anexo 14. Prueba Post-Hoc de Tuckey de la branquia izquierda (LG)



Anexo 15. ANOVA del alto de la cola (TMH)

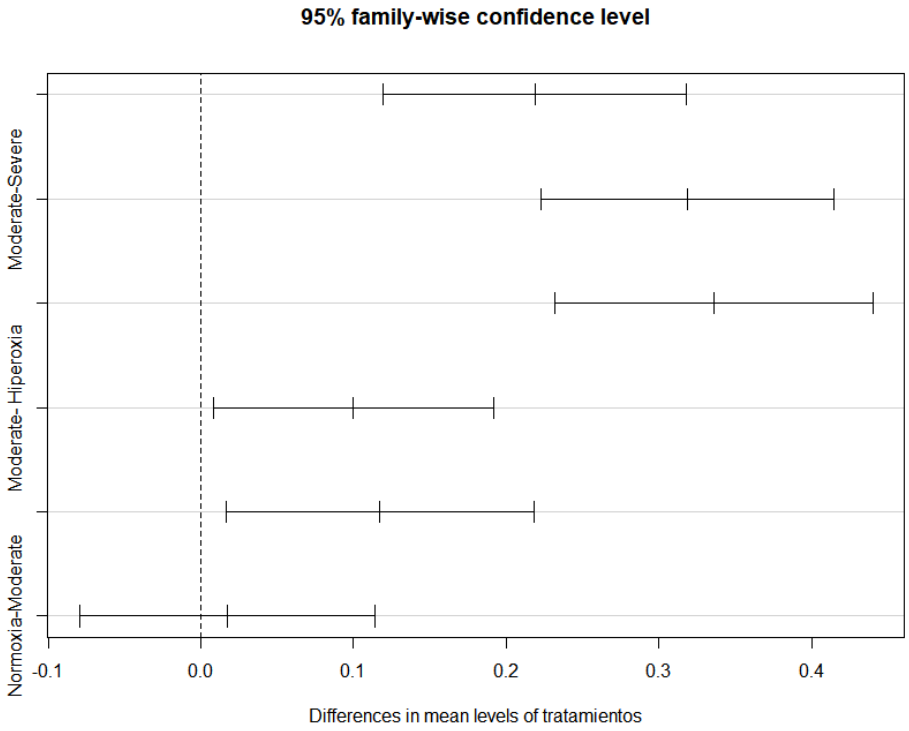
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
tratamientos	3	1.9418	0.6473	31.919	6.92e-15	***
corte	1	0.1077	0.1077	5.310	0.0231	*
tratamientos:corte	3	0.0182	0.0061	0.299	0.8259	
Residuals	109	2.2104	0.0203			

Signif. codes: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

Anexo 16. Test de normalidad de Shapiro-Wilk del alto de la cola (TMH)

data: residualestmh
W = 0.97577, p-value = 0.03245

Anexo 17. Prueba Post-Hoc de Tuckey del alto de la cola (TMH)



Anexo 18. ANOVA del largo de la cola (TAIL)

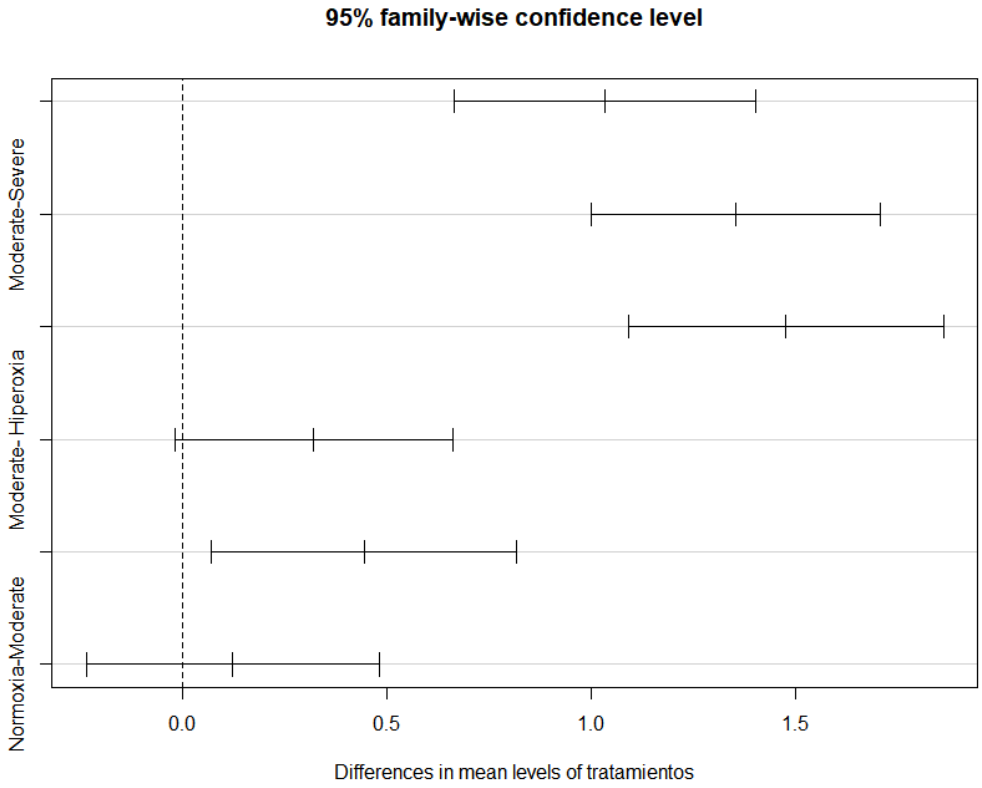
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
tratamientos	3	36.20	12.067	43.253	<2e-16	***
corte	1	1.45	1.447	5.188	0.0247	*
tratamientos:corte	3	1.14	0.380	1.363	0.2579	
Residuals	109	30.41	0.279			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Anexo 19. Test de normalidad de Shapiro-Wilk del largo de la cola (TAIL)

data: residualesrg
W = 0.98612, p-value = 0.2746

Anexo 20. Prueba Post-Hoc de Tuckey del largo de la cola (TAIL)



Anexo 21. Prueba no paramétrica utilizada para un diseño factorial de dos vías de Scheirer-Ray-Hare para las medidas del cuerpo (BL).

DV: BL
Observations: 117
D: 0.999985
MS total: 1150.5

	Df	Sum Sq	H	p.value
tratamientos	3	29417	25.5694	0.000012
corte	1	8061	7.0069	0.008120
tratamientos:corte	3	4496	3.9077	0.271608
Residuals	109	91482		

Anexo 22. Prueba de comparación múltiple de Dunn para las medidas del largo del cuerpo (BL).

Comparison	Z	P.unadj	P.adj

1 Hiperoxia - Moderada -1.1097935 2.670880e-01 5.341761e-01
2 Hiperoxia - Normoxia 0.3378607 7.354682e-01 7.354682e-01
3 Moderada - Normoxia 1.4052357 1.599512e-01 4.798536e-01
4 Hiperoxia - Severa -4.3158773 1.589703e-05 7.948515e-05
5 Moderada - Severa -3.4272536 6.097193e-04 2.438877e-03
6 Normoxia - Severa -4.4550863 8.385944e-06 5.031567e-05

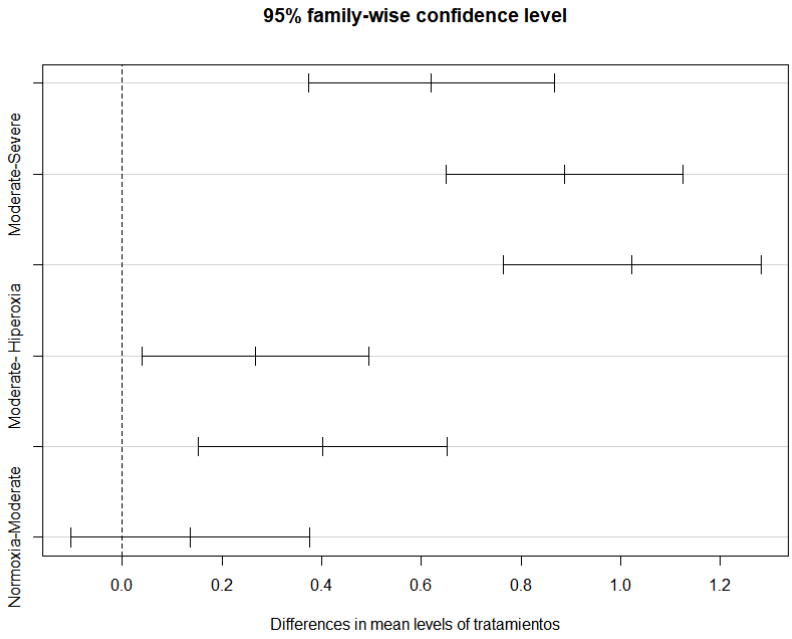
Anexo 23. ANOVA del área de la musculatura de cola (MA)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
tratamientos	3	16.527	5.509	44.065	<2e-16	***
corte	1	0.170	0.170	1.362	0.246	
tratamientos:corte	3	0.264	0.088	0.704	0.552	
Residuals	109	13.627	0.125			

Anexo 24. Test de normalidad de Shapiro-Wilk del área de la musculatura de cola (MA)

data: residualesMA
W = 0.98035, p-value = 0.08416

Anexo 25. Prueba Post-Hoc de Tuckey del área de la musculatura de cola (MA)



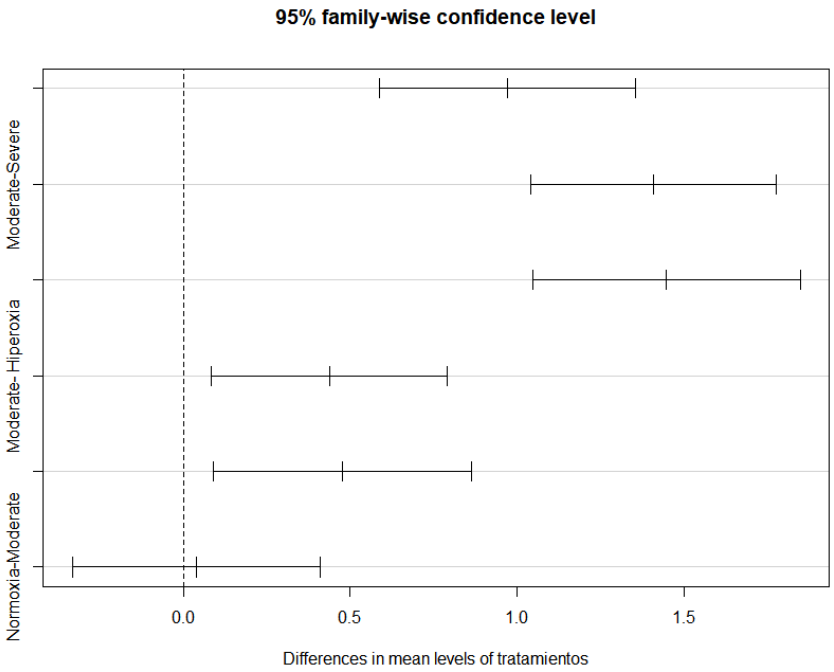
Anexo 26. ANOVA del área de la aleta de cola (FA)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
tratamientos	3	37.04	12.347	41.213	<2e-16	***
corte	1	1.21	1.214	4.052	0.0466	*
tratamientos:corte	3	0.17	0.057	0.190	0.9029	
Residuals	109	32.65	0.300			

Anexo 27. Test de normalidad de Shapiro-Wilk del área de la aleta de cola (FA)

data: residualesFA
W = 0.9926, p-value = 0.7902

Anexo 28. Prueba Post-Hoc de Tuckey del área de la aleta de cola (FA)


95% family-wise confidence level
Moderate-Severe
Moderate- Hiperoxia
Normoxia-Moderate
0.0
0.5
1.0
1.5
Differences in mean levels of tratamientos

Anexo 29. Información de las posturas y distribución de los embriones de *Hyloxalus awa* para cada tratamiento

Datos de la postura	Nº Exp	HSCut	HLCut	NCut	HiperCut	HS	HL	N	Hiper
#T4209, 20 huevos, 20/04/2018	**9**	C1, C2	C3, C4	C5,C6	C7, C8	B1, B2	B3, B4	B5, B6	B7
#T4176, 33 huevos, 20/04/2018	**10**	C1,C2,C3,C4	C5,C6,C7,C8	C9,C10,C11	C12,C13,C14,C15	B1,B2,B3,B4	B5,B6,B7	B8,B9,B10	B11,B12,B13,B14
#T4176, 14 huevos, 08/05/2018	**12**	C1,C2	C3,C4	C5	C6	B1,B2	B3	B4	B5
#T4209, 22 huevos, 22/05/2018	**14**	C1,C2	C3, C4	C5,C6	C7,C8	B1,B2	B3,B4	B5,B6	B7,B8
#T4209, 21huevos, 22/05/2018	**15**	C1	C2	C3	C4	B1	B2	B3	B4
#T4176, 17 huevos, 05/06/2018	**16**	C1,C2	C3,C4	C5	C6	B1,B5	B2	B3	B4
#T4209, 16 huevos, 05/06/2018	**17**	C1,C2	C3,C4	C5,C6	C7,C8	B1,B2	B3,B4	B5	B6
#T4209, 19 huevos, 21/06/2018	**19**	C1,C2	C3,C4,C5,C6		C7	B1	B2,B3,B4		B5
#T4176, 15 huevos, 31/07/2018	**21**	C1,C2,C3	C4,C5	C6,C7	C8,C9	B1	B2	B3	
#4176, 20 huevos, 22/10/2018	**22**	C1, C2	C3,C4	C5	C6	B1	B2	B3	B4

Anexo 30. Información de los experimentos de *H. awa*

Especie	Nº Exp	Fecha primer día	Estadio primer día	Fecha ultimo día	Estadio último día	Número de embriones	Embriones por tratamiento							
							HSCut	HLCut	NCut	HiperCut	HS	HL	N	Hiper
Hyloxalus awa	**9**	26/4/2018	19	2/5/2018	23	15	2	2	2	2	2	2	2	2
Hyloxalus awa	**10**	26/4/2018	19	2/5/2018	23	29	4	4	3	4	4	3	3	4
Hyloxalus awa	**12**	15/5/2018	19	20/5/2018	23	11	2	2	1	1	2	1	1	1
Hyloxalus awa	**14**	28/5/2018	19	2/6/2018	23	16	2	2	2	2	2	2	2	2
Hyloxalus awa	**15**	28/5/2018	19	3/6/2018	23	8	1	1	1	1	1	1	1	1
Hyloxalus awa	**16**	11/6/2018	19	16/6/2018	23	11	2	2	1	1	2	1	1	1
Hyloxalus awa	**17**	11/6/2018	19	16/6/2018	23	14	2	2	2	2	2	2	1	1
Hyloxalus awa	**19**	21/6/2018	19	27/6/2018	23	12	2	4		1	1	3		1
Hyloxalus awa	**21**	7/8/2018	19+	13/8/2018	23	12	3	2	2	2	1	1	1	
Hyloxalus awa	**22**	26/10/2018	19	31/10/2018	23	10	2	2	1	1	1	1	1	1

Anexo 31. Mediciones morfológicas de individuos de *Hyloxalus awa* por experimento en el día inicial y el día final. Experimento (Exp), Embriones (Emb), Largo total (TL), Largo de la cola (TAL), Ancho de la yema (YSW), Ancho de la cabeza (HW), Branquia derecha (RG), Branquia izquiera (LG), Alto de la musculatura de la cola (TMH), Longitud de la cola (TAIL), Longitud del cuerpo (BL), Área de la musculatura de la cola (TMA), Área del aleta de la cola (TFA).

Measurements First Day										Measurements Last Day										
Exp	**Emb**	**Trt**	**TL**	**TAL**	**YSW**	**HW**	**RG**	**LG**	**TMH**	**TL**	**TAL**	**YSW**	**HW**	**RG**	**LG**	**TMH**	**TAIL**	**BL**	**TMA**	**TFA**
9	B1	**HS**	3.83	2.70	1.65	0.86	0.26	0.26	0.66	6.70	5.61	1.89	0.90	1.39	1.27	0.81	3.47	2.39	1.50	0.73
9	B2	**HS**	3.70	2.88	1.62	0.79	0.24	0.27	0.55	6.53	5.65	1.82	1.01	1.60	1.24	0.81	3.28	2.08	1.29	1.56
9	B3	**HL**	3.29	2.52	1.60	0.78	0.30	0.23	0.53	8.02	6.89	1.89	1.23	2.64	2.19	1.18	5.03	2.12	2.29	2.59
9	B4	**HL**	3.83	2.92	2.07	0.78	0.24	0.22	0.64	7.98	6.87	1.94	1.27	4.15	3.96	1.13	4.76	2.09	2.46	2.57
9	B5	**N**	3.69	2.70	1.77	0.84	0.21	0.23	0.66	8.33	7.06	1.94	1.25	2.87	2.70	1.27	5.09	1.79	2.52	3.03
9	B6	**N**	3.41	2.65	1.86	0.81	0.32	0.33	0.62	8.57	7.33	2.07	1.34	3.27	2.70	1.01	5.11	2.03	2.97	2.27
9	B7	**Hiper**	3.58	2.76	1.69	0.77	0.26	0.24	0.64	7.61	6.41	1.90	1.20	2.07	2.04	0.97	4.37	1.88	2.00	1.72
9	C1	**HSCut**	3.81	2.98	1.88	0.81	0.11	0.09	0.59	6.26	5.33	1.96	0.95	0.66	0.19	0.63	3.38	2.28	1.46	0.74
9	C2	**HSCut**	3.65	2.89	1.87	0.79	0.08	0.08	0.60	6.42	5.50	1.97	1.00	0.73	0.73	0.79	3.37	2.31	1.44	1.19
9	C3	**HLCut**	4.11	3.10	1.96	0.84	0.13	0.08	0.70	8.20	7.14	2.14	1.28	2.48	1.68	1.25	4.97	1.99	2.80	2.64
9	C4	**HLCut**	3.76	2.84	1.94	0.85	0.06	0.12	0.66	7.87	6.72	2.10	1.24	2.31	1.85	1.10	4.86	2.02	2.25	1.88
9	C5	**NCut**	3.42	2.56	2.00	0.84	0.10	0.10	0.55	7.71	6.52	1.99	1.31	1.67	1.39	1.24	4.74	1.93	2.71	2.49
9	C6	**NCut**	3.69	2.86	2.00	0.75	0.11	0.09	0.52	8.03	6.81	2.13	1.33	1.05	0.90	1.25	5.19	2.05	2.45	3.11
9	C7	**HiperCut**	3.80	2.98	1.76	0.76	0.10	0.09	0.61	7.87	6.74	1.96	1.29	0.47	0.94	1.28	5.23	2.06	2.82	2.57
9	C8	**HiperCut**	3.89	2.98	2.07	0.82	0.08	0.09	0.65	8.30	7.12	2.10	1.40	1.25	0.98	1.11	5.35	1.90	2.58	2.41
10	B1	**HS**	3.65	2.77	1.94	0.83	0.20	0.23	0.67											
10	B2	**HS**	3.76	2.89	2.06	0.87	0.20	0.20	0.63	6.41	5.51	2.24	0.88	0.61	0.51	0.60	2.97	2.63	1.39	0.48
10	B3	**HS**	3.73	2.85	2.01	0.81	0.20	0.20	0.66	6.41	5.27	2.40	0.92	1.20	1.15	0.70	3.03	2.20	1.54	0.60
10	B4	**HS**	3.63	2.78	2.04	0.88	0.21	0.19	0.58	6.54	5.63	2.38	0.89	0.66	0.71	0.68	2.93	2.52	1.44	0.20
10	B5	**HL**	3.73	2.81	2.15	0.90	0.20	0.20	0.60	7.95	6.75	2.09	1.20	2.67	2.73	1.05	4.77	1.89	2.18	2.36
10	B6	**HL**	3.60	2.71	1.90	0.86	0.18	0.22	0.65	7.51	6.48	1.31	0.73	1.74	1.57	1.06	4.36	2.25	2.22	1.75
10	B7	**HL**	3.47	2.67	2.12	0.83	0.18	0.21	0.69											
10	B8	**N**	3.78	2.90	1.89	0.88	0.23	0.22	0.64											

10	B9	**N**	4.07	3.23	1.86	0.83	0.21	0.22	0.69	8.64	7.43	2.12	1.31	2.45	2.33	0.90	5.47	2.07	2.89	2.15
10	B10	**N**	3.82	2.97	2.15	0.85	0.23	0.23	0.71											
10	B11	**Hiper**	3.98	3.08	1.97	0.85	0.24	0.23	0.63	8.30	7.08	2.17	1.23	1.62	2.02	1.12	1.79	5.35	2.71	2.70
10	B12	**Hiper**	3.80	2.95	2.12	0.88	0.18	0.18	0.65	8.23	7.25	2.33	1.38	2.06	1.71	0.93	5.05	2.14	2.17	1.83
10	B13	**Hiper**	3.56	2.79	2.15	0.87	0.23	0.24	0.69	8.21	6.95	2.27	1.40	2.32	2.39	0.87	4.90	2.32	2.02	1.77
10	B14	**Hiper**	3.69	2.83	2.14	0.85	0.18	0.20	0.67	7.98	2.28	1.23	6.75	1.63	1.62	0.65	4.62	2.00	1.55	1.46
10	C1	**HSCut**	3.95	3.42	2.11	0.83	0.04	0.09	0.70											
10	C2	**HSCut**	3.72	2.89	2.01	0.80	0.09	0.06	0.65											
10	C3	**HSCut**	3.86	3.01	1.98	0.81	0.11	0.09	0.72	6.53	5.63	2.03	0.93	0.64	0.25	0.83	3.28	2.29	1.35	1.01
10	C4	**HSCut**	3.86	3.06	2.00	0.83	0.06	0.09	0.55											
10	C5	**HLCut**	3.85	3.07	2.06	0.84	0.08	0.10	0.52											
10	C6	**HLCut**	3.92	2.97	2.04	0.90	0.15	0.13	0.68	7.70	6.54	2.13	1.21	1.86	2.15	1.12	4.50	2.04	2.00	2.53
10	C7	**HLCut**	3.73	2.95	1.90	0.80	0.11	0.12	0.71											
10	C8	**HLCut**	3.69	2.81	1.99	0.84	0.10	0.15	0.58	8.02	6.87	2.14	1.29	1.88	1.80	1.15	4.94	1.88	2.70	2.38
10	C9	**NCut**	3.80	2.97	1.94	0.78	0.08	0.07	0.50	8.38	7.00	2.17	1.35	1.71	1.85	1.03	5.32	1.96	2.26	2.39
10	C10	**NCut**	3.60	2.71	1.99	0.76	0.08	0.08	0.64	7.91	6.81	2.52	1.24	1.44	2.06	1.06	4.82	2.30	1.98	2.70
10	C11	**NCut**	3.66	2.83	1.84	0.76	0.09	0.05	0.61	7.97	6.76	2.01	1.25	2.35	0.63	0.92	4.79	1.85	2.09	2.19
10	C12	**HiperCut**	3.99	3.09	1.85	0.80	0.05	0.12	0.67	8.49	7.17	2.18	1.40	1.00	1.22	1.00	5.38	1.80	2.40	2.39
10	C13	**HiperCut**	3.93	3.09	1.91	0.74	0.06	0.10	0.69	6.66	5.61	1.77	1.05	0.77	1.48	1.03	4.30	1.56	1.68	1.91
10	C14	**HiperCut**	3.83	2.99	2.19	0.83	0.08	0.08	0.69	6.53	5.62	1.83	1.01	0.97	1.53	0.72	3.84	1.74	1.46	0.99
10	C15	**HiperCut**	3.79	2.88	2.21	0.86	0.08	0.13	0.66	8.66	7.37	1.42	2.33	1.35	1.45	0.91	5.22	2.16	2.24	1.83
12	B1	**HS**	4.37	3.51	1.76	0.78	0.30	0.37	0.62	6.61	5.35	1.65	1.04	1.31	1.31	0.70	2.60	2.26	1.28	1.30
12	B2	**HS**	4.41	3.59	1.77	0.80	0.37	0.34	0.75	6.82	5.84	2.12	0.90	1.46	1.16	0.78	3.43	2.28	1.45	1.21
12	B3	**HL**	4.35	3.48	1.87	0.78	0.38	0.33	0.66	8.03	6.98	2.14	1.27	2.05	2.28	0.63	5.00	1.98	2.33	2.36
12	B4	**N**	4.31	3.46	1.97	0.78	0.32	0.32	0.70	8.31	7.05	2.18	1.30	2.31	2.67	1.22	5.23	1.76	2.47	3.19
12	B5	**Hiper**	4.43	3.51	1.84	0.78	0.37	0.39	0.74	8.14	6.85	2.22	1.31	2.00	1.60	0.98	4.92	1.94	2.21	2.09
12	C1	**HSCut**	4.32	3.37	1.80	0.76	0.08	0.08	0.73	6.75	5.74	2.14	0.94	0.44	0.44	0.77	3.60	2.16	1.59	0.68
12	C2	**HSCut**	4.27	3.29	1.80	0.82	0.10	0.09	0.68											
12	C3	**HLCut**	4.24	3.26	1.78	0.81	0.08	0.07	0.77	8.07	6.76	2.07	1.27	1.46	1.67	1.11	4.96	1.86	2.32	2.41
12	C4	**HLCut**	4.27	3.29	1.77	0.74	0.09	0.03	0.61	8.25	6.97	2.12	1.26	1.55	0.75	1.22	4.93	1.82	2.56	2.75
12	C5	**NCut**	4.23	3.27	1.88	0.76	0.06	0.09	0.67	8.26	6.87	2.11	1.26	0.51	0.81	1.15	4.93	1.82	2.56	2.75

12	C6	**HiperCut**	4.26	3.30	1.69	0.83	0.09	0.09	0.68	5.12	4.36	1.35	0.76	0.26	0.00	1.19	5.10	1.81	2.47	2.85
14	B1	**HS**	4.07	3.12	1.92	0.89	0.27	0.23	0.63	6.71	5.85	2.17	0.91	1.94	1.79	0.96	3.99	2.17	1.82	1.44
14	B2	**HS**	4.13	3.37	1.89	0.92	0.32	0.32	0.63	6.64	5.88	2.26	0.89	2.34	2.00	0.89	3.89	2.33	1.45	1.46
14	B3	**HL**	3.86	3.00	1.92	0.89	0.26	0.26	0.65	7.73	6.43	2.19	1.25	2.65	3.06	1.05	4.68	2.14	2.53	2.53
14	B4	**HL**	4.08	3.18	2.04	0.87	0.29	0.29	0.64	8.01	6.74	2.25	1.22	3.43	3.18	1.08	4.94	2.06	2.72	1.81
14	B5	**N**	4.06	3.12	1.88	0.90	0.25	0.31	0.62	7.93	6.60	2.15	1.30	2.81	2.80	1.07	4.96	1.96	2.63	1.82
14	B6	**N**	4.09	3.19	1.94	0.87	0.27	0.34	0.69	7.85	6.85	2.20	1.21	1.76	2.68	1.21	5.02	1.80	2.81	2.33
14	B7	**Hiper**	4.35	3.40	1.83	0.86	0.27	0.31	0.68	5.95	5.04	2.02	1.01	1.35	1.22	0.90	3.27	1.82	1.46	1.17
14	B8	**Hiper**	4.14	3.29	1.94	0.89	0.22	0.28	0.63	5.48	4.47	2.12	0.99	1.24	1.21	0.89	2.90	2.04	1.17	0.74
14	C1	**HSCut**	3.91	2.99	1.90	0.89	0.10	0.09	0.61	7.20	6.07	2.27	0.99	0.54	0.99	1.00	4.22	2.01	1.67	1.70
14	C2	**HSCut**	3.61	2.73	1.79	0.86	0.13	0.09	0.66	7.21	6.06	2.33	1.12	0.64	0.87	0.97	4.02	2.03	1.95	1.65
14	C3	**HLCut**	3.78	2.89	1.83	0.95	0.10	0.08	0.65	7.93	6.71	2.20	1.28	1.45	0.32	0.98	4.57	2.09	1.97	1.74
14	C4	**HLCut**	3.95	3.10	1.84	0.83	0.07	0.05	0.64	7.90	6.51	2.18	1.36	1.26	0.84	1.02	4.65	1.92	2.64	1.66
14	C5	**NCut**	4.21	3.22	1.73	0.85	0.12	0.10	0.65	7.80	6.49	2.20	1.35	1.28	0.92	1.11	4.70	1.90	2.68	1.59
14	C6	**NCut**	4.08	3.21	1.80	0.84	0.04	0.09	0.69	8.03	6.78	2.12	1.23	0.77	0.31	1.25	5.24	2.11	2.91	2.60
14	C7	**HiperCut**	3.97	3.06	1.91	0.92	0.07	0.06	0.62	7.84	6.53	2.15	1.25	0.35	0.78	1.08	4.68	2.09	2.40	1.72
14	C8	**HiperCut**	3.79	2.90	1.88	0.91	0.09	0.10	0.53	7.58	6.53	2.03	1.32	0.65	1.25	1.08	4.58	1.97	2.23	1.74
15	B1	**HS**	3.32	2.54	2.01	0.80	0.16	0.15	0.60	7.19	6.22	2.21	1.04	1.65	1.50	0.96	4.21	2.06	1.72	1.61
15	B2	**HL**	3.39	2.51	2.17	0.83	0.15	0.14	0.47	7.87	6.70	2.16	1.30	2.97	2.66	1.15	4.75	2.06	2.08	2.53
15	B3	**N**	3.37	2.55	1.59	0.85	0.13	0.19	0.57	7.95	6.52	2.02	1.29	2.38	3.08	1.07	4.98	2.10	2.35	2.66
15	B4	**Hiper**	3.23	2.32	1.97	0.84	0.18	0.20	0.49	7.25	6.19	2.14	1.32	1.55	1.73	1.00	4.36	1.99	2.01	1.80
15	C1	**HSCut**	3.51	2.65	2.24	0.85	0.11	0.10	0.53											
15	C2	**HLCut**	3.45	2.59	2.07	0.88	0.11	0.16	0.61	8.16	6.78	2.24	1.35	1.48	0.86	1.27	4.86	1.95	1.98	3.42
15	C3	**NCut**	3.38	2.51	1.86	0.78	0.07	0.12	0.55	7.94	6.69	2.09	1.37	0.00	0.00	1.10	4.99	1.77	2.57	2.56
15	C4	**HiperCut**	3.51	2.67	2.17	0.78	0.11	0.09	0.67	7.60	6.32	2.11	1.24	1.07	0.79	1.01	4.54	1.76	1.99	2.36
16	B1	**HS**	3.83	2.95	1.87	0.82	0.47	0.42	0.66	6.83	5.76	2.31	1.07	1.35	1.33	0.74	3.59	2.57	1.54	0.64
16	B5	**HS**	3.52	2.61	1.91	0.81	0.15	0.30	0.61											
16	B2	**HL**	3.93	2.99	1.87	0.85	0.38	0.42	0.64	8.41	7.03	2.19	1.33	3.23	2.70	1.22	5.41	1.88	2.60	3.17
16	B3	**N**	4.02	3.07	2.03	0.86	0.43	0.45	0.57	8.21	6.94	2.28	1.38	2.91	3.57	1.30	5.15	1.92	2.49	3.08
16	B4	**Hiper**	3.83	2.87	1.83	0.93	0.46	0.40	0.69	8.54	7.19	2.30	1.35	1.41	1.42	1.31	5.35	2.02	2.49	3.39
16	C1	**HSCut**																		

16	C2	**HSCut**																	
16	C3	**HLCut**	4.13	3.09	2.04	0.82	0.07	0.07	0.67	8.20	6.92	2.27	1.38	1.28	0.76	1.26	5.19	1.93	2.24	3.18
16	C4	**HLCut**	4.19	3.23	1.90	0.83	0.13	0.07	0.73	8.20	6.83	2.21	1.36	1.15	1.87	1.31	5.05	2.08	2.65	3.09
16	C5	**NCut**	3.97	3.01	1.93	0.79	0.09	0.12	0.70	8.21	7.01	2.37	1.32	0.37	1.33	1.25	4.73	2.20	2.57	2.92
16	C6	**HiperCut**	4.30	3.31	2.01	0.87	0.13	0.13	0.67	8.34	7.03	2.40	1.38	0.42	0.85	1.20	5.11	2.08	2.61	2.67
17	B1	**HS**	3.62	2.71	2.04	0.76	0.28	0.27	0.57											
17	B2	**HS**																		
17	B3	**HL**																		
17	B4	**HL**	3.77	2.90	2.09	0.81	0.27	0.21	0.69	8.15	6.92	2.24	1.36	3.00	2.53	0.98	4.99	1.98	2.18	2.22
17	B5	**N**																		
17	B6	**Hiper**	3.65	2.71	2.05	0.82	0.20	0.16	0.64	7.86	6.62	2.13	1.32	1.87	1.91	1.12	4.89	1.96	2.35	2.39
17	C1	**HSCut**																		
17	C2	**HSCut**																		
17	C3	**HLCut**	4.07	3.01	2.13	0.82	0.07	0.10	0.67	8.35	7.01	2.18	1.34	1.18	0.23	1.21	5.34	1.93	2.75	2.82
17	C4	**HLCut**	3.71	2.75	2.12	0.81	0.09	0.11	0.44	7.84	6.54	2.18	1.36	1.23	1.62	1.08	4.70	2.08	2.26	2.06
17	C5	**NCut**	3.90	2.90	2.18	0.79	0.08	0.10	0.69	8.08	6.71	2.23	1.28	1.12	1.33	1.15	5.18	1.87	2.48	2.55
17	C6	**NCut**	3.90	2.85	2.17	0.83	0.09	0.12	0.65	8.27	6.92	2.30	1.36	1.43	1.55	1.15	5.04	1.86	2.36	2.97
17	C7	**HiperCut**	3.99	2.93	2.02	0.84	0.13	0.11	0.50	8.03	6.67	1.32	2.24	1.10	0.71	1.15	4.93	1.79	1.99	2.44
17	C8	**HiperCut**	3.64	2.68	2.11	0.75	0.10	0.13	0.66	8.03	6.64	2.18	1.27	0.98	1.67	1.04	5.03	1.74	2.31	2.38
19	B1	**HS**	3.50	2.68	1.60	0.81	0.22	0.19	0.54	6.31	5.27	2.26	1.09	0.98	0.60	0.75	3.34	2.30	1.62	0.86
19	B2	**HL**	3.36	2.51	1.98	0.71	0.18	0.19	0.51	7.50	6.26	2.80	1.23	1.25	1.29	0.75	3.80	2.23	1.23	1.55
19	B3	**HL**	3.54	2.64	1.78	0.80	0.33	0.36	0.63	7.89	6.58	2.16	1.31	2.81	2.52	1.22	5.33	1.89	2.72	2.99
19	B4	**HL**	4.00	3.18	1.62	0.75	0.30	0.35	0.71	8.26	7.00	2.03	1.37	2.83	2.27	1.23	5.23	1.78	2.94	3.18
19	B5	**Hiper**	3.58	2.69	1.86	0.79	0.29	0.29	0.61	7.92	6.70	2.10	1.27	1.65	2.20	1.12	5.05	1.95	2.44	2.44
19	C1	**HSCut**	3.87	3.07	1.77	0.76	0.12	0.07	0.64	5.74	4.73	2.15	0.94	0.46	0.19	0.78	3.73	1.93	1.46	1.34
19	C2	**HSCut**	3.65	2.79	1.56	0.79	0.04	0.06	0.62	6.27	5.15	2.20	0.43	0.43	0.27	0.86	3.46	2.05	1.35	1.82
19	C3	**HLCut**	3.73	2.84	1.84	0.80	0.09	0.07	0.65	7.90	6.68	2.30	1.35	1.53	0.29	1.16	4.67	1.86	2.29	2.88
19	C4	**HLCut**	3.94	3.09	1.76	0.79	0.12	0.07	0.66	8.45	7.15	2.22	1.41	0.87	1.70	1.21	5.16	2.10	2.51	3.08
19	C5	**HLCut**	3.91	2.95	1.71	0.83	0.11	0.07	0.66	8.67	7.41	2.18	1.40	1.53	0.00	1.18	5.58	2.07	2.89	2.77
19	C6	**HLCut**	3.86	2.95	1.68	0.80	0.09	0.07	0.66	8.57	7.30	2.09	1.44	0.00	1.32	1.26	5.13	2.13	2.60	3.74
19	C7	**HiperCut**	3.77	2.88	1.94	0.84	0.12	0.07	0.61	8.13	6.81	2.18	1.34	1.43	0.99	1.26	5.13	1.85	2.51	3.39

21	B1	**HS**	3.84	2.83	1.97	0.82	0.28	0.26	0.56	7.42	6.23	2.25	1.13	2.40	1.61	0.89	4.29	1.98	1.84	1.54
21	B2	**HL**	4.18	3.30	1.96	0.80	0.31	0.31	0.69	8.19	7.04	2.20	1.30	1.28	1.22	1.23	5.41	1.84	2.80	3.16
21	B3	**N**	3.99	2.96	1.84	0.83	0.32	0.35	0.74	8.25	7.02	2.14	1.30	2.57	2.85	1.20	4.96	1.97	2.71	2.87
21	C1	**HSCut**	3.96	3.45	2.16	0.82	0.04	0.09	0.73	6.82	5.87	2.12	1.04	0.23	0.31	0.84	3.47	2.09	1.48	1.41
21	C2	**HSCut**	3.79	2.84	2.12	0.81	0.09	0.06	0.69	7.09	5.96	1.98	1.08	0.54	0.86	0.89	4.27	1.84	1.68	1.60
21	C3	**HSCut**	4.06	3.10	1.97	0.76	0.07	0.01	0.64	7.64	6.55	2.16	1.15	0.84	1.00	1.04	4.59	1.85	2.21	1.88
21	C4	**HLCut**	3.71	2.80	1.99	0.81	0.04	0.07	0.61	8.11	6.94	2.13	1.30	0.63	1.00	1.00	5.06	1.80	2.27	2.20
21	C5	**HLCut**	4.14	3.18	1.97	0.82	0.07	0.03	0.58	7.91	6.53	2.10	1.36	0.95	0.94	1.15	4.83	1.82	2.64	2.06
21	C6	**NCut**	4.12	3.27	1.98	0.78	0.09	0.04	0.57	8.41	7.10	2.15	1.35	0.58	0.51	1.14	5.52	1.56	2.90	2.98
21	C7	**NCut**	4.18	3.26	1.95	0.86	0.05	0.07	0.61	8.27	6.91	2.04	1.33	0.50	0.42	1.20	5.17	1.82	2.48	2.91
21	C8	**HiperCut**	4.23	3.25	2.01	0.81	0.06	0.07	0.68	6.54	5.37	2.19	1.23	1.06	0.26	0.93	3.66	1.58	1.52	1.58
21	C9	**HiperCut**	4.19	3.39	1.89	0.80	0.05	0.07	0.68	7.95	6.58	2.12	1.33	0.14	0.63	1.15	4.74	1.86	2.20	2.72
22	B1	**HS**	3.82	2.77	2.24	0.81	0.26	0.22	0.69	6.65	5.62	2.35	1.12	1.09	1.08	0.82	3.13	2.37	1.39	1.27
22	B2	**HL**	3.86	3.08	2.23	0.85	0.28	0.25	0.66	8.54	7.20	2.05	1.27	2.73	2.92	1.10	5.06	1.95	2.35	2.81
22	B3	**N**	4.15	3.29	1.97	0.89	0.29	0.29	0.60	8.56	7.18	1.78	1.24	3.77	3.82	1.10	5.26	1.88	2.72	2.64
22	B4	**Hiper**	3.72	2.74	2.09	0.86	0.28	0.25	0.67	8.79	7.49	2.25	1.42	1.72	2.41	1.16	5.53	1.95	2.95	2.93
22	C1	**HSCut**	3.91	3.07	2.13	0.84	0.06	0.07	0.70	7.19	6.03	2.15	0.96	0.21	0.63	0.84	4.40	1.97	1.87	1.39
22	C2	**HSCut**	4.24	3.09	2.07	0.91	0.06	0.06	0.65											
22	C3	**HLCut**	3.98	2.99	2.17	0.82	0.09	0.07	0.70	9.09	7.89	2.31	1.39	1.09	1.27	1.30	5.65	1.96	3.33	3.51
22	C4	**HLCut**	4.18	3.11	2.12	0.97	0.06	0.07	0.62	9.10	7.79	2.25	1.38	0.72	0.46	1.40	5.63	1.95	3.14	3.68
22	C5	**NCut**	4.08	3.04	2.13	0.89	0.06	0.04	0.70	9.38	7.92	2.19	1.52	1.34	1.67	1.27	5.64	1.94	3.24	3.56
22	C6	**HiperCut**	4.08	2.96	2.17	0.84	0.07	0.08	0.65	8.50	7.18	2.20	1.31	0.00	0.91	1.10	5.54	1.98	2.75	2.86

Anexo 32. Diferencia delta de la medición morfológica de la Longitud Total en *Hyloxalus awa.*

LONGITUD TOTAL							
GILLS				GILLS-CUT			
Exp	Código	Tratamiento	Variac. Delta	Exp	Código	Tratamiento	Variac. Delta
9	B7	Hiper	4.0312	9	C7	HiperCut	4.0718
10	B11	Hiper	4.3295	9	C8	HiperCut	4.4105
10	B12	Hiper	4.42743	10	C12	HiperCut	4.5042
10	B13	Hiper	4.6513	10	C13	HiperCut	2.7295
10	B14	Hiper	4.2924	10	C14	HiperCut	2.7001
12	B5	Hiper	3.7056	10	C15	HiperCut	4.8626
14	B7	Hiper	1.6042	12	C6	HiperCut	0.8614
14	B8	Hiper	1.341	14	C7	HiperCut	3.8717
15	B4	Hiper	4.0224	14	C8	HiperCut	3.7887
16	B4	Hiper	4.71029	15	C4	HiperCut	4.0897
17	B6	Hiper	4.2119	16	C6	HiperCut	4.0423
19	B5	Hiper	4.3381	17	C7	HiperCut	4.0405
22	B4	Hiper	5.0692	17	C8	HiperCut	4.3944
9	B5	N	4.6382	19	C7	HiperCut	4.35691
9	B6	N	5.1625	21	C8	HiperCut	2.31412
10	B9	N	4.5731	21	C9	HiperCut	3.7521
12	B4	N	4.0056	22	C6	HiperCut	4.41814
14	B5	N	3.8701	9	C5	NCut	4.2896
14	B6	N	3.7553	9	C6	NCut	4.3379
15	B3	N	4.5725	10	C9	NCut	4.5803
16	B3	N	4.1922	10	C10	NCut	4.3129
21	B3	N	4.2659	10	C11	NCut	4.3101
22	B3	N	4.411	12	C5	NCut	4.0357
9	B3	HL	4.732	14	C5	NCut	3.5912

9	B4	HL	4.1432	14	C6	NCut	3.9529
10	B5	HL	4.2182	15	C3	NCut	4.5631
10	B6	HL	3.9094	16	C5	NCut	4.2422
12	B3	HL	3.6841	17	C5	NCut	4.17969
14	B3	HL	3.8637	17	C6	NCut	4.3687
14	B4	HL	3.92753	21	C6	NCut	4.2897
15	B2	HL	4.4807	21	C7	NCut	4.08228
16	B2	HL	4.4813	22	C5	NCut	5.29887
17	B4	HL	4.3808	9	C3	HLCut	4.084
19	B2	HL	4.1388	9	C4	HLCut	4.1115
19	B3	HL	4.35	10	C6	HLCut	3.78042
19	B4	HL	4.26311	10	C8	HLCut	4.3294
21	B2	HL	4.0079	12	C3	HLCut	3.8334
22	B2	HL	4.67514	12	C4	HLCut	3.9794
9	B1	HS	2.8658	14	C3	HLCut	4.1509
9	B2	HS	2.8363	14	C4	HLCut	3.9469
10	B2	HS	2.65047	15	C2	HLCut	4.7158
10	B3	HS	2.678	16	C3	HLCut	4.0746
10	B4	HS	2.9131	16	C4	HLCut	4.0043
12	B1	HS	2.2345	17	C3	HLCut	4.28568
12	B2	HS	2.4136	17	C4	HLCut	4.1355
14	B1	HS	2.6339	19	C3	HLCut	4.1744
14	B2	HS	2.5098	19	C4	HLCut	4.5119
15	B1	HS	3.8667	19	C5	HLCut	4.758
16	B1	HS	3.00643	19	C6	HLCut	4.712
19	B1	HS	2.815	21	C4	HLCut	4.3996
21	B1	HS	3.5816	21	C5	HLCut	3.7729
22	B1	HS	2.8344	22	C3	HLCut	5.10747
				22	C4	HLCut	4.92273
				9	C1	HSCut	2.4482

9	C2	HSCut	2.7639
10	C3	HSCut	2.6646
12	C1	HSCut	2.4347
14	C1	HSCut	3.2886
14	C2	HSCut	3.60166
19	C1	HSCut	1.8775
19	C2	HSCut	2.6227
21	C1	HSCut	2.86814
21	C2	HSCut	3.29626
21	C3	HSCut	3.58798
22	C1	HSCut	3.2808

Anexo 33. Diferencia delta de la medición morfológica de la Longitud-cuerpo cola en *Hyloxalus awa.*

LONGITUD CUERPO-COLA							
GILLS				GILLS CUT			
Exp	Código	Tratamiento	Variac. Delta	Exp	Código	Tratamiento	Variac. Delta
9	B7	Hiper	3.6455	9	C7	HiperCut	3.7665
10	B11	Hiper	3.9939	9	C8	HiperCut	4.1342
10	B12	Hiper	4.3014	10	C12	HiperCut	4.0802
10	B13	Hiper	4.1604	10	C13	HiperCut	2.5144
10	B14	Hiper	-0.5514	10	C14	HiperCut	2.6221
12	B5	Hiper	3.3351	10	C15	HiperCut	4.4878
14	B7	Hiper	1.6395	12	C6	HiperCut	1.063
14	B8	Hiper	1.1802	14	C7	HiperCut	3.4694
15	B4	Hiper	3.876	14	C8	HiperCut	3.6281
16	B4	Hiper	4.3253	15	C4	HiperCut	3.6545
17	B6	Hiper	3.9084	16	C6	HiperCut	3.7227
19	B5	Hiper	4.008	17	C7	HiperCut	3.7362
22	B4	Hiper	4.7485	17	C8	HiperCut	3.9533
9	B5	N	4.3573	19	C7	HiperCut	3.9208
9	B6	N	4.677	21	C8	HiperCut	2.1194
10	B9	N	4.2021	21	C9	HiperCut	3.1867
12	B4	N	3.589	22	C6	HiperCut	4.2223
14	B5	N	3.484	9	C5	NCut	3.9598
14	B6	N	3.6621	9	C6	NCut	3.9489
15	B3	N	3.976	10	C9	NCut	4.03
16	B3	N	3.8606	10	C10	NCut	4.1037
21	B3	N	4.0634	10	C11	NCut	3.9357
22	B3	N	3.8885	12	C5	NCut	3.6074

9	B3	HL	4.3664	14	C5	NCut	3.269
9	B4	HL	3.9528	14	C6	NCut	3.5701
10	B5	HL	3.9401	15	C3	NCut	4.17845
10	B6	HL	3.771	16	C5	NCut	3.9999
12	B3	HL	3.4923	17	C5	NCut	3.8058
14	B3	HL	3.4254	17	C6	NCut	4.067
14	B4	HL	3.5539	21	C6	NCut	3.8256
15	B2	HL	4.1969	21	C7	NCut	3.6583
16	B2	HL	4.046	22	C5	NCut	4.8781
17	B4	HL	4.0131	9	C3	HLCut	4.0349
19	B2	HL	3.7493	9	C4	HLCut	3.8809
19	B3	HL	3.9403	10	C6	HLCut	3.5684
19	B4	HL	3.8283	10	C8	HLCut	4.0615
21	B2	HL	3.73924	12	C3	HLCut	3.4952
22	B2	HL	4.125	12	C4	HLCut	3.6765
9	B1	HS	2.9115	14	C3	HLCut	3.8239
9	B2	HS	2.7709	14	C4	HLCut	3.4101
10	B2	HS	2.6188	15	C2	HLCut	4.1891
10	B3	HS	2.4183	16	C3	HLCut	3.8275
10	B4	HS	2.852	16	C4	HLCut	3.5934
12	B1	HS	1.8353	17	C3	HLCut	3.9992
12	B2	HS	2.254	17	C4	HLCut	3.789
14	B1	HS	2.7368	19	C3	HLCut	3.8359
14	B2	HS	2.5073	19	C4	HLCut	4.0613
15	B1	HS	3.6865	19	C5	HLCut	4.4602
16	B1	HS	2.8057	19	C6	HLCut	4.3476
19	B1	HS	2.5897	21	C4	HLCut	4.14204
21	B1	HS	3.3992	21	C5	HLCut	3.3536
22	B1	HS	2.8525	22	C3	HLCut	4.9078
				22	C4	HLCut	4.6777

9	C1	HSCut	2.3482
9	C2	HSCut	2.6095
10	C3	HSCut	2.615
12	C1	HSCut	2.3764
14	C1	HSCut	3.0764
14	C2	HSCut	3.3289
19	C1	HSCut	1.6558
19	C2	HSCut	2.365
21	C1	HSCut	2.4165
21	C2	HSCut	3.1191
21	C3	HSCut	3.4569
22	C1	HSCut	2.9636

Anexo 34. Diferencia delta del ancho de la yema en *Hyloxalus awa*

ANCHO DE LA YEMA							
GILLS				GILLS-CUT			
Exp	Código	Tratamiento	Variac. Delta	Exp	Código	Tratamiento	Variac. Delta
9	B7	Hiper	0.2031	9	C7	HiperCut	0.2045
10	B11	Hiper	0.196	9	C8	HiperCut	0.0279
10	B12	Hiper	0.2127	10	C12	HiperCut	0.3326
10	B13	Hiper	0.1189	10	C13	HiperCut	-0.1472
10	B14	Hiper	-0.9034	10	C14	HiperCut	-0.3672
12	B5	Hiper	0.373	10	C15	HiperCut	-0.7906
14	B7	Hiper	0.1811	12	C6	HiperCut	-0.3454
14	B8	Hiper	0.1778	14	C7	HiperCut	0.2378
15	B4	Hiper	0.1681	14	C8	HiperCut	0.1527
16	B4	Hiper	0.4706	15	C4	HiperCut	-0.0571
17	B6	Hiper	0.0795	16	C6	HiperCut	0.3929
19	B5	Hiper	0.2385	17	C7	HiperCut	-0.6972
22	B4	Hiper	0.1596	17	C8	HiperCut	0.0723
9	B5	N	0.1628	19	C7	HiperCut	0.2438
9	B6	N	0.2129	21	C8	HiperCut	0.1781
10	B9	N	0.256	21	C9	HiperCut	0.234
12	B4	N	0.208	22	C6	HiperCut	0.0266
14	B5	N	0.268	9	C5	NCut	-0.0079
14	B6	N	0.2665	9	C6	NCut	0.1249
15	B3	N	0.4337	10	C9	NCut	0.2326
16	B3	N	0.2421	10	C10	NCut	0.5303

21	B3	N	0.3089	10	C11	NCut	0.16366
22	B3	N	-0.1952	12	C5	NCut	0.2357
9	B3	HL	0.286	14	C5	NCut	0.4751
9	B4	HL	-0.1271	14	C6	NCut	0.3236
10	B5	HL	-0.0681	15	C3	NCut	0.2273
10	B6	HL	-0.5913	16	C5	NCut	0.4368
12	B3	HL	0.2733	17	C5	NCut	0.0492
14	B3	HL	0.2685	17	C6	NCut	0.1385
14	B4	HL	0.2107	21	C6	NCut	0.1678
15	B2	HL	-0.0168	21	C7	NCut	0.0874
16	B2	HL	0.3238	22	C5	NCut	0.0606
17	B4	HL	0.1506	9	C3	HLCut	0.1798
19	B2	HL	0.8188	9	C4	HLCut	0.1539
19	B3	HL	0.3865	10	C6	HLCut	0.0904
19	B4	HL	0.4101	10	C8	HLCut	0.1573
21	B2	HL	0.2412	12	C3	HLCut	0.2921
22	B2	HL	-0.1774	12	C4	HLCut	0.3539
9	B1	HS	0.2404	14	C3	HLCut	0.3717
9	B2	HS	0.1978	14	C4	HLCut	0.337
10	B2	HS	0.1714	15	C2	HLCut	0.1681
10	B3	HS	0.3949	16	C3	HLCut	0.2331
10	B4	HS	0.3432	16	C4	HLCut	0.3107
12	B1	HS	-0.1006	17	C3	HLCut	0.0488
12	B2	HS	0.3496	17	C4	HLCut	0.0641
14	B1	HS	0.2487	19	C3	HLCut	0.4559
14	B2	HS	0.367	19	C4	HLCut	0.4596
15	B1	HS	0.2036	19	C5	HLCut	0.4668
16	B1	HS	0.43987	19	C6	HLCut	0.4185
19	B1	HS	0.6518	21	C4	HLCut	0.1476
21	B1	HS	0.2782	21	C5	HLCut	0.1365

22	B1	HS	0.1087	22	C3	HLCut	0.1406
				22	C4	HLCut	0.1241
				9	C1	HSCut	0.0731
				9	C2	HSCut	0.1013
				10	C3	HSCut	0.0485
				12	C1	HSCut	0.339
				14	C1	HSCut	0.3689
				14	C2	HSCut	0.5438
				19	C1	HSCut	0.3787
				19	C2	HSCut	0.638
				21	C1	HSCut	-0.039
				21	C2	HSCut	-0.1325
				21	C3	HSCut	0.1886
				22	C1	HSCut	0.0171

Anexo 35. Diferencia delta de la branquia derecha en *Hyloxalus awa*

BRANQUIA DERECHA							
GILLS				GILLS-CUT			
Exp	**Código**	**Tratamiento**	**Variac. Delta**	**Exp**	**Código**	**Tratamiento**	**Variac. Delta**
9	B7	Hiper	1.8059	9	C7	HiperCut	0.369
10	B11	Hiper	1.3878	9	C8	HiperCut	1.173
10	B12	Hiper	1.8799	10	C12	HiperCut	0.9486
10	B13	Hiper	2.0914	10	C13	HiperCut	0.7033
10	B14	Hiper	1.4494	10	C14	HiperCut	0.8948
12	B5	Hiper	1.6261	10	C15	HiperCut	1.2797
14	B7	Hiper	1.077	12	C6	HiperCut	0.1757
14	B8	Hiper	1.0196	14	C7	HiperCut	0.27716
15	B4	Hiper	1.3698	14	C8	HiperCut	0.5605
16	B4	Hiper	0.95153	15	C4	HiperCut	0.96
17	B6	Hiper	1.6614	16	C6	HiperCut	0.2926
19	B5	Hiper	1.363	17	C7	HiperCut	0.9757
22	B4	Hiper	1.434	17	C8	HiperCut	0.8738
9	B5	N	2.6582	19	C7	HiperCut	1.3094
9	B6	N	2.94564	21	C8	HiperCut	1.0007
10	B9	N	2.2377	21	C9	HiperCut	0.0948
12	B4	N	1.98705	22	C6	HiperCut	-0.06632
14	B5	N	2.5589	9	C5	NCut	1.57638
14	B6	N	1.4831	9	C6	NCut	0.9456
15	B3	N	2.2504	10	C9	NCut	1.6286
16	B3	N	2.485	10	C10	NCut	1.3549
21	B3	N	2.25204	10	C11	NCut	2.2562
22	B3	N	3.4853	12	C5	NCut	0.4488

9	B3	HL	2.3375	14	C5	NCut	1.1593
9	B4	HL	3.9048	14	C6	NCut	0.7281
10	B5	HL	2.47	15	C3	NCut	-0.0733
10	B6	HL	1.5601	16	C5	NCut	0.2715
12	B3	HL	1.6703	17	C5	NCut	1.0387
14	B3	HL	2.3926	17	C6	NCut	1.3404
14	B4	HL	3.1384	21	C6	NCut	0.4829
15	B2	HL	2.8188	21	C7	NCut	0.45112
16	B2	HL	2.849	22	C5	NCut	1.2793
17	B4	HL	2.7321	9	C3	HLCut	2.34322
19	B2	HL	1.0716	9	C4	HLCut	2.25695
19	B3	HL	2.48106	10	C6	HLCut	1.7035
19	B4	HL	2.5275	10	C8	HLCut	1.7814
21	B2	HL	0.96869	12	C3	HLCut	1.3827
22	B2	HL	2.4509	12	C4	HLCut	1.4575
9	B1	HS	1.13046	14	C3	HLCut	1.3565
9	B2	HS	1.3627	14	C4	HLCut	1.1848
10	B2	HS	0.4093	15	C2	HLCut	1.3642
10	B3	HS	1.0071	16	C3	HLCut	1.2128
10	B4	HS	0.4571	16	C4	HLCut	1.0202
12	B1	HS	1.01555	17	C3	HLCut	1.1077
12	B2	HS	1.0878	17	C4	HLCut	1.139
14	B1	HS	1.669	19	C3	HLCut	1.44198
14	B2	HS	2.02309	19	C4	HLCut	0.752
15	B1	HS	1.4944	19	C5	HLCut	1.4177
16	B1	HS	0.8853	19	C6	HLCut	-0.0915
19	B1	HS	0.7582	21	C4	HLCut	0.58576
21	B1	HS	2.1183	21	C5	HLCut	0.8776
22	B1	HS	0.8331	22	C3	HLCut	1.0004
				22	C4	HLCut	0.6574

9	C1	HSCut	0.55615
9	C2	HSCut	0.6466
10	C3	HSCut	0.5299
12	C1	HSCut	0.3625
14	C1	HSCut	0.4434
14	C2	HSCut	0.5118
19	C1	HSCut	0.3386
19	C2	HSCut	0.3934
21	C1	HSCut	0.19317
21	C2	HSCut	0.4432
21	C3	HSCut	0.7723
22	C1	HSCut	0.15115

Anexo 36. Diferencia delta de la branquia izquierda en *Hyloxalus awa*

BRANQUIA IZQUIERDA							
GILLS				GILLS-CUT			
Exp	Código	Tratamiento	Variac. Delta	Exp	Código	Tratamiento	Variac. Delta
9	B7	Hiper	1.7979	9	C7	HiperCut	0.8537
10	B11	Hiper	1.78158	9	C8	HiperCut	0.886
10	B12	Hiper	1.5226	10	C12	HiperCut	1.1017
10	B13	Hiper	2.1544	10	C13	HiperCut	1.3811
10	B14	Hiper	1.4202	10	C14	HiperCut	1.45137
12	B5	Hiper	1.2072	10	C15	HiperCut	1.3186
14	B7	Hiper	0.9019	12	C6	HiperCut	-0.08633
14	B8	Hiper	0.9325	14	C7	HiperCut	0.7244
15	B4	Hiper	1.5381	14	C8	HiperCut	1.1501
16	B4	Hiper	1.01671	15	C4	HiperCut	0.6954
17	B6	Hiper	1.7495	16	C6	HiperCut	0.72
19	B5	Hiper	1.9055	17	C7	HiperCut	0.59695
22	B4	Hiper	2.1597	17	C8	HiperCut	1.535
9	B5	N	2.4697	19	C7	HiperCut	0.91742
9	B6	N	2.3685	21	C8	HiperCut	0.1907
10	B9	N	2.103	21	C9	HiperCut	0.566
12	B4	N	2.35567	22	C6	HiperCut	0.82939
14	B5	N	2.4963	9	C5	NCut	1.2835
14	B6	N	2.33276	9	C6	NCut	0.80258
15	B3	N	2.8901	10	C9	NCut	1.7826
16	B3	N	3.1164	10	C10	NCut	1.9812
21	B3	N	2.4988	10	C11	NCut	0.5797
22	B3	N	3.5253	12	C5	NCut	0.7237

9	B3	HL	1.9622	14	C5	NCut	0.817
9	B4	HL	3.73665	14	C6	NCut	0.2197
10	B5	HL	2.5274	15	C3	NCut	-0.122
10	B6	HL	1.3478	16	C5	NCut	1.2177
12	B3	HL	1.9546	17	C5	NCut	1.2322
14	B3	HL	2.8043	17	C6	NCut	1.4224
14	B4	HL	2.8898	21	C6	NCut	0.472
15	B2	HL	2.5183	21	C7	NCut	0.35255
16	B2	HL	2.2822	22	C5	NCut	1.6337
17	B4	HL	2.3142	9	C3	HLCut	1.6014
19	B2	HL	1.0973	9	C4	HLCut	1.7244
19	B3	HL	2.1627	10	C6	HLCut	2.0211
19	B4	HL	1.9261	10	C8	HLCut	1.6462
21	B2	HL	0.91134	12	C3	HLCut	1.6018
22	B2	HL	2.6692	12	C4	HLCut	0.7213
9	B1	HS	1.0126	14	C3	HLCut	0.2366
9	B2	HS	0.9659	14	C4	HLCut	0.79
10	B2	HS	0.3084	15	C2	HLCut	0.6979
10	B3	HS	0.9442	16	C3	HLCut	0.6875
10	B4	HS	0.51673	16	C4	HLCut	1.791
12	B1	HS	0.94125	17	C3	HLCut	0.1283
12	B2	HS	0.8109	17	C4	HLCut	1.5121
14	B1	HS	1.56	19	C3	HLCut	0.2236
14	B2	HS	1.68018	19	C4	HLCut	1.626
15	B1	HS	1.3471	19	C5	HLCut	-0.074
16	B1	HS	0.9114	19	C6	HLCut	1.254
19	B1	HS	0.4094	21	C4	HLCut	0.9278
21	B1	HS	1.35244	21	C5	HLCut	0.90624
22	B1	HS	0.8578	22	C3	HLCut	1.1993
				22	C4	HLCut	0.3872

9	C1	HSCut	0.1026
9	C2	HSCut	0.64731
10	C3	HSCut	0.1609
12	C1	HSCut	0.3602
14	C1	HSCut	0.9039
14	C2	HSCut	0.7748
19	C1	HSCut	0.1172
19	C2	HSCut	0.212
21	C1	HSCut	0.2226
21	C2	HSCut	0.8012
21	C3	HSCut	0.98392
22	C1	HSCut	0.5672

Anexo 37. Diferencia delta del ancho de la cola en *Hyloxalus awa*

ANCHO DE LA MUSCULATURA DE LA COLA							
GILLS				GILLS-CUT			
Exp	Código	Tratamiento	Variac. Delta	Exp	Código	Tratamiento	Variac. Delta
9	B7	Hiper	0.33	9	C7	HiperCut	1.28
10	B11	Hiper	0.49	9	C8	HiperCut	1.11
10	B12	Hiper	0.28	10	C12	HiperCut	1
10	B13	Hiper	0.18	10	C13	HiperCut	1.03
10	B14	Hiper	-0.02	10	C14	HiperCut	0.72
12	B5	Hiper	0.24	10	C15	HiperCut	0.91
14	B7	Hiper	0.22	12	C6	HiperCut	1.19
14	B8	Hiper	0.26	14	C7	HiperCut	1.08
15	B4	Hiper	0.51	14	C8	HiperCut	1.08
16	B4	Hiper	0.62	15	C4	HiperCut	1.01
17	B6	Hiper	0.48	16	C6	HiperCut	1.2
19	B5	Hiper	0.51	17	C7	HiperCut	1.15
22	B4	Hiper	0.4925	17	C8	HiperCut	1.04
9	B5	N	0.61	19	C7	HiperCut	1.2566
9	B6	N	0.39	21	C8	HiperCut	0.93109
10	B9	N	0.21	21	C9	HiperCut	1.1464
12	B4	N	0.52	22	C6	HiperCut	1.1035
14	B5	N	0.45	9	C5	NCut	1.24
14	B6	N	0.52	9	C6	NCut	1.25
15	B3	N	0.5	10	C9	NCut	1.03
16	B3	N	0.73	10	C10	NCut	1.06
21	B3	N	0.4596	10	C11	NCut	0.92
22	B3	N	0.4975	12	C5	NCut	1.15

9	B3	HL	0.65	14	C5	NCut	1.11
9	B4	HL	0.49	14	C6	NCut	1.25
10	B5	HL	0.45	15	C3	NCut	1.1
10	B6	HL	0.41	16	C5	NCut	1.25
12	B3	HL	-0.03	17	C5	NCut	1.15
14	B3	HL	0.4	17	C6	NCut	1.15
14	B4	HL	0.44	21	C6	NCut	1.14119
15	B2	HL	0.68	21	C7	NCut	1.1988
16	B2	HL	0.58	22	C5	NCut	1.2707
17	B4	HL	0.29	9	C3	HLCut	1.25
19	B2	HL	0.24	9	C4	HLCut	1.1
19	B3	HL	0.59	10	C6	HLCut	1.12
19	B4	HL	0.52	10	C8	HLCut	1.1531
21	B2	HL	0.5435	12	C3	HLCut	1.11
22	B2	HL	0.4375	12	C4	HLCut	1.22
9	B1	HS	0.15	14	C3	HLCut	0.98
9	B2	HS	0.26	14	C4	HLCut	1.02
10	B2	HS	-0.03	15	C2	HLCut	1.27
10	B3	HS	0.04	16	C3	HLCut	1.26
10	B4	HS	0.1	16	C4	HLCut	1.31
12	B1	HS	0.08	17	C3	HLCut	1.21
12	B2	HS	0.03	17	C4	HLCut	1.08
14	B1	HS	0.33	19	C3	HLCut	1.16
14	B2	HS	0.26	19	C4	HLCut	1.21
15	B1	HS	0.36	19	C5	HLCut	1.18
16	B1	HS	0.08	19	C6	HLCut	1.26
19	B1	HS	0.21	21	C4	HLCut	1.00288
21	B1	HS	0.3275	21	C5	HLCut	1.1541
22	B1	HS	0.1342	22	C3	HLCut	1.3009
				22	C4	HLCut	1.4025

9	C1	HSCut	0.63
9	C2	HSCut	0.7864
10	C3	HSCut	0.83
12	C1	HSCut	0.77
14	C1	HSCut	1
14	C2	HSCut	0.97
19	C1	HSCut	0.78
19	C2	HSCut	0.86
21	C1	HSCut	0.8421
21	C2	HSCut	0.8868
21	C3	HSCut	1.03739
22	C1	HSCut	0.8417

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Heisel Carolina Ricaurte Mejía, con C.I. 1722886080, autora del trabajo de graduación titulado: “Efecto de la disponibilidad de oxígeno y amputación de las branquias embrionarias en el desarrollo embrionario tardío de *Hyloxalus awa* (Dendrobatidae)”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, Noviembre del 2019

C.I. 1722886080