

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Morfología de los embriones desde la blástula hasta la eclosión del
renacuajo de dos especies de *Atelopus* (Anura: Bufonidae)**

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

JUAN JIMÉNEZ MERINO

Quito, 2013

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

Certifico que la disertación de la Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Juan Jiménez Merino ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Eugenia M. del Pino V.

Directora de la Disertación

23 de Mayo de 2013

A Marinita

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, por ser mi guía y mi paz.

A toda mi familia, que siempre me ha regalado su afecto incondicional.

A la Dra. Eugenia del Pino, por toda la confianza, el cariño y el apoyo que me ha sabido dar.

A las becas de investigación otorgadas a la Doctora del Pino y a la Balsa de los Sapos, por los recursos proporcionados para la elaboración de este trabajo.

A mis amigos del Laboratorio de Biología del Desarrollo, Naty, Alexandra, Andrés, Angelita, Kari, Majo y Panchita, por su invaluable ayuda y paciencia.

A los compañeros y profesores con los que compartí el estudio de mi carrera universitaria, todos han sido grandes maestros.

A los miembros del Ensamble Zambrower y del dojo Kamikaze Kaewsamrit, que tanto me han ayudado a crecer y seguir adelante en este periodo de mi vida. Gracias, hermanos. Agradezco de manera especial a René, Alejo y Raúl, excelentes maestros y amigos.

A Belén, por sólo ser ella, y haberme regalado tanta felicidad así.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	11
2. ABSTRACT	12
3. INTRODUCCIÓN.....	13
4.1 OBTENCIÓN DE EMBRIONES.....	27
4.2 MANIPULACIÓN DE EMBRIONES	27
4.2.1. SOLUCIONES Y TAMPONES.....	27
4.2.1.1. PBS (TAMPÓN FOSFATO SALINO)	27
4.2.2. PROCESAMIENTO DE EMBRIONES	28
5. RESULTADOS	32
5.1. REPRODUCCIÓN DE <i>Atelopus sp.</i> Y <i>Atelopus elegans.</i>	32
5.2. EL DESARROLLO TEMPRANO DE <i>Atelopus sp.</i> Y <i>Atelopus elegans.</i>	32
5.3. EL PROCESO DE CLIVAJE Y LA BLÁSTULA.....	34
5.3.1. BLÁSTULA DE CÉLULAS GRANDES (ESTADIO 7)	34
5.3.2. BLÁSTULA DE CÉLULAS MEDIANAS (ESTADIO 8)	34
5.3.3. BLÁSTULA DE CÉLULAS PEQUEÑAS (ESTADIO 9)	35
5.4. MORFOLOGÍA DEL PROCESO DE GASTRULACIÓN (ESTADIOS DEL 10 AL 13).....	35
5.4.1. LABIO DORSAL DEL BLASTOPORO (ESTADIO 10)	35
5.4.2. EMBRIÓN CON TAPÓN DE YEMA GRANDE (ESTADIO 11).	36
5.4.3. EMBRIÓN CON TAPÓN DE YEMA PEQUEÑO (ESTADIO 12,5).	36
5.4.4. POST-GÁSTRULA (ESTADIO 13).....	36
5.5. MORFOLOGÍA DE LA NÉURULA (ESTADIOS 15 y 16).....	37
5.5.1. NÉURULA MEDIA (ESTADIO 15)	37
5.5.2. NÉURULA TARDÍA (ESTADIO 16)	37

5.6. MORFOLOGÍA DE LOS ESTADIOS DE RESPUESTA MUSCULAR COLA Y ECLOSIÓN (ESTADIOS 19 Y 21).....	38
5.6.1. RESPUESTA MUSCULAR (ESTADIO 18).....	38
5.6.2. EL EMBRIÓN A LA ECLOSIÓN (ESTADIO 21)	39
6. DISCUSIÓN.....	40
6.1. EL DESARROLLO DE <i>Atelopus sp.</i> Y <i>Atelopus elegans</i>	40
6.2. LOS ESTADIOS DE CLIVAJE Y BLASTULA EN COMPARACIÓN CON OTROS ANFIBIOS.....	42
6.3. EL MODO DE GASTRULACIÓN DE <i>Atelopus sp.</i> Y <i>Atelopus elegans</i> EN COMPARACIÓN CON OTRAS ESPECIES DE ANUROS	42
6.4. LA ESTRATEGIA REPRODUCTIVA DE LAS RANAS DEL GÉNERO <i>Atelopus</i> EN RELACIÓN A SU DESARROLLO	46
8. FIGURAS	58
9. TABLAS.....	80
10. ANEXOS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Una postura de <i>Atelopus elegans</i>	59
Figura 2. Resumen del desarrollo temprano de <i>Atelopus sp.</i> y <i>Atelopus elegans</i>	610
Figura 3. Morfología del estadio de blástula de células medianas de <i>Atelopus sp.</i> (estadio 7).	632
Figura 4. Morfología del estadio de blástula de células pequeñas de <i>Atelopus elegans</i> (estadio 9)	654
Figura 5. Morfología de la gástrula temprana de <i>Atelopus sp.</i> y <i>Atelopus elegans</i> (estadio 10).....	676
Figura 6. Morfología de la gástrula temprana de <i>Atelopus sp.</i> y <i>Atelopus elegans</i> (estadio 11).....	68
Figura 7. Morfología de la gástrula tardía de <i>Atelopus sp.</i> (estadio 12.5):.....	69
Figura 8. Morfología de la posgástrula de <i>Atelopus sp.</i> (estadio 13).	721
Figura 9. Morfología de la posgástrula de la néurula de <i>Atelopus elegans</i> . (estadio 15)..	743
Figura 10. Morfología de la néurula tardía de <i>Atelopus sp.</i> y <i>Atelopus elegans</i> (estadios 16 y 16+).....	765
Fig. 11 Vista externa del estadio de respuesta muscular de <i>Atelopus sp.</i> y <i>Atelopus elegans</i> (Estadio 18)	77
Fig. 12 Morfología de embriones a la eclosión de <i>Atelopus elegans</i> (estadio 21)	798

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estadios del desarrollo de <i>Atelopus</i> en relación a la tabla del desarrollo de <i>Xenopus laevis</i> (Niewkoop y Faber, 1994) y la tabla general de Gosner (1960).	81
Tabla 2. Tiempo, en horas, minutos y días, entre los estadios (en concordancia con Gosner, 1960) del desarrollo obtenidos en las fijaciones de <i>Atelopus sp.</i> y <i>Atelopus elegans</i>	82

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Dibujos esquemáticos del movimiento morfogenético de rotación vegetal en <i>X. laevis</i> para diferentes estadios de la gástrula (Winklbauer y Shürfeld, 1998).....	84
Anexo 2. Tabla generalizada para el desarrollo temprano de anuros de Gosner (1960).....	85
Anexo 3. Estadios del desarrollo de <i>X. laevis</i> según el criterio morfológico de la tabla normalizada de Nieuwkoop y Faber (1994) (Cebra-Thomas, 2003).....	86
Anexo 4. Diámetros de huevo y tiempos de gastrulación en varias especies de anuros. El tiempo de gastrulación es el tiempo que transcurre entre la formación del labio dorsal y el cierre del blastoporo.	87
Anexo 5. Renacuajo de <i>Atelopus ignescens ignescens</i> . (Duellman y Lynch, 1969).	88

1. RESUMEN

Las especies del género *Atelopus* se encuentran amenazadas, por lo que es importante realizar estudios sobre su biología. Se describen y se analizan los patrones morfológicos del desarrollo embrionario, desde el estadio de blástula hasta la eclosión de los renacuajos, de dos especies de ranas ecuatorianas: *Atelopus sp.* y *Atelopus elegans* (Anura: Bufonidae). Estas ranas poseen un modo reproductivo acuático, y realizan sus posturas en agua corriente. La morfología de los embriones fue analizada mediante montajes enteros y secciones de vibrátomo. Adicionalmente, se realizaron tinciones de fluorescencia para núcleos celulares. La postura completa estudiada contenía 619 huevos. Los embriones poseían poco pigmento nuclear, desarrollo rápido y un diámetro pequeño (1.4 mm para ambas especies). El desarrollo temprano de estas especies fue homologado con los estadios propuestos en las tablas de *X. laevis* y general para el desarrollo de anfibios de Gosner (1960). La morfología de la blástula y la gástrula sugiere un patrón de desarrollo similar al de *X. laevis*. La elongación del arquenterón se inicia antes del cerramiento del blastoporo. Los primeros somitas fueron detectados en la néurula temprana. En estadios posteriores, los embriones de *Atelopus* difieren morfológicamente de *X. laevis*. Entre los rasgos distintivos de los estadios avanzados, se encuentra una glándula adhesiva conspicua, el desarrollo interno de las branquias y la ausencia de pigmento hasta la eclosión. Las características del desarrollo de *Atelopus* posiblemente estén asociadas a adaptaciones al modo reproductivo acuático y al desarrollo en lugares crípticos asociados a rocas. Ésta es la primera descripción del desarrollo temprano en ranas del género *Atelopus*.

Palabras clave: *Atelopus elegans*, Jambato, Blástula, Gastrulación, Desarrollo rápido, *Xenopus laevis*.

2. ABSTRACT

Atelopus species are currently endangered, thus it is important to carry studies regarding their biology. This study describes and analyzes the morphological patterns of the embryonic development, from blastula to tadpole hatching, in two Ecuadorian frog species: *Atelopus sp.* and *Atelopus elegans*. (Anura: Bufonidae). These frogs possess an acuatic reproductive mode, and make their ovipositions in running water. Embryo morphology was analyzed in whole mount preparations and vibratome sections. Additionally, fluorescence staining for nuclei was applied. Each frog spawn contained numerous embryos, lacking pigment, with fast development and small diameter (1.4 mm for both species). The early development of these species was homologated with the staging tables for *X. laevis* and Gosner's generalized staging table for amphibian development (1960). The morphology of the blastula and the gastrula suggests a development pattern resembling the one of *X. laevis*. The elongation of the archenteron and begins before blastopore closure. The first somites were detected in the early néurula. At later stages, however, embryos of *Atelopus* differ morphologically from *X. laevis*. Among the distinctive traits of the advanced stages there are a conspicuous adhesive gland, the internal development of the gills, and the absence of pigment until hatching. The characteristics of *Atelopus* development are possibly associated with adaptation for an acuatic reproductive mode and to the development in criptic locations linked to the under surface of rocks. This is the first description of early development in frogs of the genus *Atelopus*.

Key Words: *Atelopus elegans*, Jambato, Blastula, Gastrulation, Rapid development, *Xenopus laevis*.

3. INTRODUCCIÓN

En el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE se realizan estudios comparativos en varias especies de anuros. Estas características incluyen la tasa del desarrollo, el tamaño del huevo y la expresión de marcadores moleculares de eventos trascendentes del desarrollo. (revisado en Elinson y del Pino, 2012). Sobre la base de los estudios realizados en estas características del desarrollo se han separado a las especies de anuros estudiadas en dos grupos: ranas de desarrollo lento y ranas de desarrollo rápido (del Pino, 1996; del Pino *et al.*, 2004; del Pino *et al.*, 2007; Moya *et al.*, 2007; Nieuwkoop y Faber, 1994; Venegas-Ferrín *et al.*, 2010).

Para comprender los rasgos diferenciales encontrados en el desarrollo de especies ecuatorianas de anuros, es necesario hacer una comparación de estas características sobre la base del desarrollo de *Xenopus laevis*. En la rana modelo del desarrollo, *X. laevis*, el desarrollo embrionario se inicia con la fertilización y la subsiguiente rotación cortical, que consiste en un arreglo de los microtúbulos del huevo en función del punto de entrada del espermatozoide (Wolpert *et al.*, 2007). Esta entrada puede ocurrir en cualquier punto del hemisferio animal del huevo, y provoca que la capa externa de citoplasma, el cortex, se separe y rote en relación al citoplasma interno. La región vegetal del córtex es del sitio de entrada del espermatozoide y determina el futuro lado dorsal del embrión. Esto ocurre debido a que los microtúbulos del cortex se orientan en dirección opuesta al punto de entrada del espermatozoide, sirviendo como guías para el movimiento de moléculas de señalización hacia una nueva ubicación (Gilbert, 2009). La distribución espacial de moléculas es determinante para el desarrollo temprano del embrión, puesto que posteriormente en el desarrollo esta distribución le otorgará su identidad al organizador. El organizador es una región localizada

del embrión que ejerce una influencia especial en las células adyacentes y juega un papel determinante en su desarrollo (Gilbert, 2009). En el caso de la blástula de *Xenopus*, el centro de señalización que se desarrolla en la región dorsal vegetal se denomina centro de Nieuwkoop, y es responsable de establecer la polaridad dorso-ventral inicial en la blástula. El factor que induce al centro de Nieuwkoop en el extremo dorsal de las células vegetales es la β -catenina. La β -catenina es una proteína multifuncional que puede actuar como molécula de anclaje para cadherinas en la membrana celular o como un factor de transcripción nuclear. En los embriones de *Xenopus*, la β -catenina se comienza a acumular en la región dorsal del huevo durante los movimientos citoplasmáticos de la fertilización. A continuación, el embrión inicia la fase de clivaje, la cual consiste de una serie de divisiones celulares simultáneas rápidas sin que se produzca aumento en el tamaño de las células (Nieuwkoop y Faber, 1994). En urodelos y la mayoría de anuros las divisiones celulares son holoblásticas, radialmente simétricas y desiguales con respecto a los hemisferios animal y vegetal (Wolpert *et al.*, 2007). Durante este proceso, la β -catenina continua acumulándose en la región dorsal vegetal, y es observable en los núcleos de las células dorsales. Durante el clivaje tardío, las células que contienen β -catenina se hallan específicamente en el centro de Nieuwkoop. La β -catenina es necesaria para formar el eje dorsal, puesto que la anulación experimental de transcritos β -catenina con oligonucleótidos contrasentido resulta en la ausencia de estructuras dorsales (revisado por Heasman, 2006).

Cuando el embrión llega al estadio de 128 células se vuelve evidente una cavidad llena de fluido, ubicada en el polo animal, denominada blastocele. En este punto del desarrollo el embrión inicia la siguiente etapa: la blástula. En anuros el blastocele cumple dos funciones principales: permitir la migración celular durante la gastrulación y prevenir la interacción de

las células del piso con las células del techo del blastocele. Esto se debe a que estos grupos de células poseen destinos distintos: mientras que el techo del blastocele llegará a formar ectodermo, las del piso darán origen a estructuras endodermales. (Gilbert, 2009).

En *Xenopus*, la mayoría de genes no se expresan sino hasta después del doceavo ciclo celular (Newport y Kirschner, 1982). Después de este umbral, los ciclos celulares se vuelven asíncronos y los blastómeros adquieren la capacidad de volverse móviles. Esta fase es esencial debido a que en ella, los genes cigóticos empiezan a ser transcritos, y es conocida como la transición media de la blástula (Gilbert, 2009). Los cambios que ocurren durante este período son efectuados por factores de transcripción represores sensibles a la proporción de ADN y citoplasma presente en cada célula. Después de determinado umbral de concentración de ADN, la cantidad de represores no es suficiente para adherirse a todos los sitios disponibles en existencia. Esto produce que cese la represión de ciertos genes e inicie su transcripción (Gilbert, 2009).

En el siguiente estadio del desarrollo, denominado gástrula, ocurren movimientos celulares significativos que determinan la ubicación definitiva de las tres capas germinales: el endodermo, el mesodermo y el ectodermo. La inducción del mesodermo es un evento clave en el desarrollo de vertebrados ya que está íntimamente ligado a los procesos morfogenéticos de la gastrulación y a la generación de señales esenciales para el desarrollo del embrión (Symes y Smith, 1987). En embriones de *X. laevis*, la inducción mesodérmica se produce durante la blástula (revisado por Wolpert *et al.*, 2007). Las células que poseen un destino mesodermal (mesodermo prospectivo), producto de la inducción, se ubican en la zona marginal de involución. El polo animal dará origen al ectodermo y la región inferior del polo vegetal dará origen al endodermo (revisado por Gilbert, 2009). Los genes cigóticos *Brachyury*,

Eomesodermin y *Antipodean*, son los primeros genes mesodermales en expresarse y constituyen la respuesta más temprana a la inducción mesodermal (revisado por Heasman, 2006). En *Xenopus*, el endodermo es capaz de inducir la formación de mesodermo al provocar que las células de mesodermo presuntivo expresen el gen *Brachyury* (*Xbra*). El gen *Brachyury* es un gen altamente conservado y juega un rol importante en la formación del mesodermo y en los movimientos de gastrulación (revisado por Tada y Smith, 2001). En *X. laevis*, la expresión más temprana de *Brachyury* (*XBra*) se produce en las células profundas de la región ecuatorial o IMZ, en la gástrula temprana. La detección del *XBra* en este estadio genera una señal en forma de anillo que muestra la ubicación del mesodermo prospectivo (Smith *et al.* 1991). A diferencia de *X. laevis*, en la mayoría de anfibios el mesodermo prospectivo se ubica en la región superficial de la IMZ (revisado por Keller, 1999). Un segundo dominio de expresión del gen *Brachyury* es en los tejidos donde se produce la extensión convergente del mesodermo (Yamada, 1994). La detección de este gen produce una señal que marca la zona de elongación dorsal, en el notocordio, y por lo tanto, el inicio de la extensión convergente. Posteriormente, la señal permanece en el mesodermo posterior de la yema de la cola (Smith *et al.*, 1991).

El modelo de las cuatro señales de la diferenciación del mesodermo involucra cuatro distintas vías de señalización molecular y explica la forma en la cual el mesodermo se especifica y adquiere su patrón dorsoventral (revisado por Gilbert, 2009). La primera señal es la vía de inducción mesodermal primaria que utiliza a las señales *VegT*, *Nodal* (*Xenopus* Nodal-related proteins o *Xnr's*), *Derriere* y *Activin*, entre otros miembros de la superfamilia TGF- β . La segunda vía proviene del centro de Nieuwkoop, en la región vegetal – dorsal de la blástula, y se encarga de inducir al futuro organizador dorsal; este grupo de señales actúa

mediante la vía canónica de señalización de Wnt (revisado por Heasman, 2006). Los siguientes dos tipos de señales se generan en el mesodermo inducido y establecen el patrón dorsal-ventral del mesodermo. Las proteínas secretadas por el organizador de Spemann constituyen el tercer tipo de señales y poseen una acción dorsalizante (revisado por Wolpert *et al.*, 2007). *Noggin*, *Chordin*, *Follistatin*, *Frizbee*, *Cerberus*, entre otras proteínas secretadas por el organizador, son capaces de autodiferenciar en mesodermo dorsal al tejido en el que son producidas y especificar las regiones laterales del organizador, el mesodermo paraxial. Estas señales también son capaces de iniciar los movimientos de involución y convergencia y extensión, en la zona dorsal (revisado por Gilbert, 2003). El cuarto tipo de señales promueve la ventralización del mesodermo. La cuarta vía de señalización es activada por los transcritos maternos *BMP2* y *BMP7*, los cuales activan a *BMP4* y *Xwnt8* (revisado por Heasman, 2006).

El primer indicio de la gastrulación es la formación de un hundimiento de células endodermales hacia el lado dorsal del embrión, conocido como labio dorsal del blastoporo. Las células que se invaginan para formar el labio dorsal del blastoporo cambian su forma dramáticamente. La sección gruesa de cada célula está dirigida hacia el interior del embrión mientras que la célula mantiene contacto con la superficie externa mediante un cuello estrecho. La estructura de esta región es de importancia particular para el desarrollo, pues es donde se localiza el organizador de Spemann-Mangold, sin el cual no ocurrirá desarrollo dorsal. Esto ocurre gracias a que el organizador de Spemann-Mangold expresa genes específicos, con lo que induce el desarrollo de estructuras axiales (revisado en Niehrs, 2004). El organizador ha sido dividido en organizadores de cabeza, tronco y cola, según sus propiedades inductivas en distintas regiones. Uno de los genes del organizador es *Lhx1*, y su expresión ectópica en el labio ventral del blastoporo de *X. laevis* causa duplicación del eje

dorsal (Taira *et al.*, 1992). En embriones de *X. laevis*, *XLhx1* se expresa en todo el mesodermo axial de la gástrula y de la néurula (Taira *et al.*, 1992). El mesodermo axial se deriva del mesodermo que involucre a lo largo de la línea media, y abarca a la placa precordial, también conocida como mesodermo de cabeza, y al notocordio. En la gástrula temprana, *XLhx1* también se expresa en las regiones lateral y ventral del mesodermo prospectivo (Taira *et al.*, 1992). Otros genes del organizador se expresan sólo en la placa precordial, o sólo en el notocordio. Los genes homeobox goosecoid (*gsc*) y orthodenticle (*Otx2*) se expresan en la placa precordial. *Brachyury (Bra)* se expresa en el notocordio de *X. laevis* (revisado en Gilbert, 2009)

Tras la formación del labio dorsal, el endodermo y mesodermo prospectivos en la zona marginal se desplazan hacia el interior a través del blastoporo como una capa coherente de células. Cuando estas células marginales en migración alcanzan el labio dorsal del blastoporo, giran hacia el interior y viajan a lo largo de la superficie interna del hemisferio animal. Por consiguiente, las células que constituyen el labio dorsal del blastoporo están cambiando constantemente. Las primeras células que componen el labio dorsal del blastoporo son las células con forma de botella que se invaginan desde el límite del arquenterón. Estas células darán lugar eventualmente a las células faríngeas del intestino anterior. Después de que estas células pasan al interior del embrión, el labio dorsal del blastoporo cambia a estar formado por células que se derivarán posteriormente en la placa precordial (precursora del mesodermo de la cabeza). Finalmente, las siguientes células que involucren a través del labio dorsal del blastoporo son denominadas células del cordamesodermo, y darán lugar al notocordio (Wolpert *et al.*, 2007).

Una vez dentro, los tejidos convergen y se extienden a lo largo del eje antero-posterior

debajo del ectodermo dorsal. Al mismo tiempo el ectodermo se extiende hacia abajo hasta cubrir a todo el embrión en epíbole. La capa involucionante de endodermo dorsal está apegada al mesodermo, y el espacio entre esta y las células de endodermo es conocido como arquenterón. El arquenterón es el precursor de la cavidad del intestino. El movimiento de ingreso del endodermo y mesodermo comienza en el labio dorsal y se extiende hasta formar un círculo completo alrededor del blastoporo, limitado por dos labios laterales y uno ventral (Browder e Iten, 1998; Wolpert *et al.*, 2007).

En la gastrulación se producen 4 movimientos: la rotación vegetal, la involución, la convergencia y extensión dorsales, y la epíbole (Wolpert *et al.*, 2007). El primer movimiento que ocurre en la gastrulación es la rotación vegetal. Este movimiento dirige el enrollamiento de la zona marginal, que constituye el primer paso de la involución del mesodermo, y la expansión del piso del blastocele. La rotación vegetal ocurre mediante la distorsión morfológica de las células vegetales, y da lugar a la hendidura de Brachet, que separa al endomesodermo del ectodermo (Winklbauer y Shürfeld, 1999).

La involución es el ingreso de las células que formarán el mesodermo y endodermo hacia el interior del embrión. Este movimiento morfogenético consiste en un cambio en la forma de las células del blastoporo y su consecuente desplazamiento hacia el interior del embrión. Como consecuencia, existe un movimiento continuo de la capa de células a través del labio dorsal del blastoporo durante la gastrulación (Karp y Berrill, 1981).

Al mismo tiempo en que las células ingresan por involución, las células del polo animal se extienden para cubrir al embrión mediante el cuarto movimiento morfogenético: La epíbole. La epíbole es la intercalación entre células ectodermales profundas y superficiales de tal manera que el ectodermo recubra a todo el embrión (Keller *et al.*, 2003). Una vez que las

células del mesodermo y endodermo han ingresado, ocurre la convergencia y extensión dorsal. La convergencia y extensión dorsal ocurre en el mesodermo dorsal y en el sistema nervioso posterior prospectivo, por intercalación celular. Este movimiento provoca que varias capas de células se desplacen y alcancen una disposición alargada en la dimensión anteroposterior y angosta en la dimensión mediolateral durante la gastrulación y la neurulación (Keller, 1976). El proceso de elongación del arquenterón, al parecer, es producto de mecanismos tanto dependientes de los movimientos de la convergencia y extensión dorsal como independientes de estos (Ewald *et al.* 2004).

Los movimientos de la gastrulación terminan cuando se cierra el blastoporo, y por lo tanto el endodermo y el mesodermo se encuentran en el interior del embrión. El blastocele ha sido desplazado hacia la región ventral y el arquenterón ha culminado su formación. De esta manera quedan establecidas las principales características estructurales del plan corporal del embrión (Browder, 1984). El endodermo dará origen al tracto digestivo, los pulmones y el hígado; el mesodermo, al sistema esquelético, los músculos y los aparatos circulatorio y reproductor; y el ectodermo, dará origen a la epidermis y al sistema nervioso (Browder, 1984). El mapa de destino de la blástula de *Xenopus* muestra las ubicaciones de las capas germinales prospectivas previas a la gastrulación. El hemisferio animal del embrión se convertirá en ectodermo, la región vegetal rica en yema, que ocupa un tercio del embrión, dará lugar a la mayoría del endodermo, y el mesodermo se formará a partir de una franja a modo de cinturón en la región ecuatorial de la blástula (Wolpert *et al.*, 2007).

La siguiente etapa del desarrollo es la neurulación. Esta etapa determina la formación del tubo neural, el cual dará lugar al sistema nervioso central a partir de una capa plana de células ectodermales denominada placa neural. La placa neural corresponde a la región del

ectodermo que se localiza por encima del notocordio (Wolpert *et al.*, 2007). Al comenzar la neurulación, se forman dos pliegues en los bordes de la placa neural: los pliegues neurales. A lo largo de la neurulación, los pliegues neurales se levantan y eventualmente se fusionan en la línea media para formar el tubo neural. Las estructuras principales que pueden ser reconocidas en este estadio son el tubo neural, el notocordio y los somitas, el mesodermo lateral y el endodermo delineando el intestino (Gilbert, 2009).

En estadios más avanzados se distinguirán las distintas partes de los somitas. La región más dorsal da lugar al dermatoma, que formará la dermis. El resto del somita da lugar a las vértebras y a los músculos del tronco. La placa lateral, que se ubica lateral y ventralmente respecto a los somitas, da lugar a los tejidos del corazón y los riñones, así como a las gónadas y a los músculos del intestino, mientras que el mesodermo más ventral se diferenciará en tejidos formadores de sangre.

El endodermo adyacente al intestino también generará órganos tales como los pulmones y el hígado. En estadios más avanzados del desarrollo, el tubo neural se diferenciará en las partes del cerebro y cordón espinal.

Las células de los pliegues neurales no formarán parte del ectodermo de piel ni del tubo neural, sino que darán origen a la cresta neural. Tras el cerramiento del tubo neural, este conjunto de células, que constituye la cresta neural, se separa en forma de mesénquima. Las células de la cresta neural migran por diferentes rutas y dan origen a diversas estructuras. Entre estas estructuras se encuentran la estructura esquelética de la cabeza, el sistema nervioso periférico, células de pigmento, algunas células endócrinas y neuronas. (Wolpert *et al.*, 2007). Posteriormente, en los estadios de organogénesis, las capas germinales interactúan

entre sí para dar origen a tejidos completos y órganos, mientras los embriones toman la forma de renacuajos (Wolpert *et al.*, 2007).

Las diferencias que se han encontrado en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE entre distintas especies de anuros se refieren particularmente a variaciones en los eventos de la gastrulación. La gastrulación ha evolucionado, dentro del grupo de los anfibios, a la par con las diferentes estrategias reproductivas presentes. Por lo tanto, se puede asumir que varía con las modificaciones en tamaño de huevo, contenido y distribución de la yema y velocidad del desarrollo (revisado por del Pino *et al.*, 2007). Los estudios sobre el desarrollo embrionario en anfibios que difieren en sus modos reproductivos han generado evidencia de la existencia de modificaciones en los patrones del desarrollo. Los rasgos diferenciales en la gastrulación de distintas especies de anuros fueron estudiados mediante los análisis de la expresión de *Brachyury* como marcador del mesodermo prospectivo; y *Lhx1* como marcador del mesodermo axial y del sistema nervioso central (del Pino, 1996; Moya *et al.*, 2007; Venegas-Ferrín *et al.*, 2010).

En la gástrula de los embriones de *Engystomops coloradorum* y *Engystomops randi*, cuyos huevos son pequeños y se desarrollan rápidamente, la elongación del notocordio y del arquenterón se sobrelapan con la involución del labio dorsal del blastoporo (del Pino *et al.*, 2007). El mismo sobrelapamiento se da en los embriones de *Xenopus laevis* (Keller, 1976; Keller *et al.*, 2003). En los embriones de los dendrobátidos y en *Eleutherodactylus coqui*, los cuales tienen un desarrollo más lento que el de *X. laevis*, la involución y la elongación del arquenterón ocurren durante la gastrulación (del Pino *et al.*, 2007). En estas especies, la elongación del notocordio y, por lo tanto, la convergencia y extensión dorsal ocurren después de que el blastoporo se ha cerrado, es decir, posteriormente al estadio de gástrula (del Pino,

1996; del Pino *et al.*, 2007; Moya *et al.*, 2007). Debido a la ausencia de convergencia y extensión dorsal en esta etapa, aquellas células que involucionan durante la gastrulación permanecen en el labio del blastoporo de las especies con desarrollo lento. Como consecuencia, ocurre convergencia y engrosamiento en labio del blastoporo, este se engrosa y forma un collar circunblastoporal prominente alrededor del blastoporo cerrado del embrión (del Pino *et al.*, 2004; Moya *et al.*, 2007, Elinson y del Pino, 2012).

En el caso de *Gastrotheca riobambae*, cuyo desarrollo también es lento, únicamente la involución ocurre en la gastrulación (Moya *et al.*, 2007). El análisis de la gástrula en esta especie demuestra que el evento principal en la gastrulación de los anuros es la involución de las células en el labio dorsal del blastoporo. Adicionalmente, la segregación temporal de la convergencia y extensión dorsales, la elongación del arquenterón y la involución en distintas especies apoya la hipótesis de una gastrulación de naturaleza modular en anuros (del Pino *et al.*, 2007).

El estudio de la ontogenia de especies diversas de anfibios permite reconocer los patrones fundamentales de su desarrollo temprano, los cuales no pueden analizarse únicamente a partir del estudio de organismos modelo. Esto es posible gracias a las diferencias radicales que se encuentran en los aspectos del desarrollo entre especies con modos reproductivos diferentes. Según Duellman y Trueb (1986), los modos reproductivos en los anfibios muestran una diversidad mayor que cualquier otro grupo de vertebrados. La gran diversidad de modos reproductivos se debe a dos factores principales: la larga historia filogenética del grupo y la exposición que sufren los embriones a los ambientes externos diversos (Elinson y del Pino, 2012). Algunos ejemplos de estos modos reproductivos son la fertilización interna, la construcción de nidos de espuma, la incubación de los huevos en el

cuerpo del adulto y el desarrollo directo del embrión (Duellmann y Trueb, 1986).

Con el propósito de ampliar el panorama de la investigación del desarrollo temprano de los anfibios, se estudia en el presente trabajo el desarrollo temprano de las ranas del género *Atelopus*, un grupo en el cual no se han realizado estudios previos respecto a su embriología.

Las ranas del género *Atelopus* presentan un modo reproductivo acuático: El más común dentro de los anfibios (Duellmann y Trueb, 1986). Las hembras ovipositan en lugares crípticos, adhiriendo los huevos a las paredes de piedras en cuerpos de agua corriente. Allí, los huevos se desarrollan hasta que el renacuajo eclosiona. (Boistel *et al.*, 2005; Lötters, 1996). Los renacuajos de este género se caracterizan por poseer cuerpos aplanados ventralmente, colas cortas, una boca terminal ventral y un disco suctorial a manera de ventosa posterior a la boca (Starret, 1967). Las larvas continúan su vida en el agua, donde mantienen una alimentación bentónica hasta realizar metamorfosis (Starret, 1967; Duellman y Lynch, 1969).

Las ranas del género *Atelopus* también son conocidas como jambatos o ranas arlequín, y constituyen el grupo más diverso de la familia Bufonidae. *Atelopus* cuenta con 81 especies reconocidas formalmente y 32 especies nuevas (Frost, 2007; Lötters, 1996). La distribución de las especies del género *Atelopus* incluye las regiones que van desde Costa Rica hasta Bolivia y la Guyana Francesa, y desde el nivel del mar hasta los 4500 metros sobre el nivel del mar (Frost, 2007). Sin embargo, la mayoría de especies se distribuyen en hábitats montanos (Lötters, 1996). Estas especies se encuentran en áreas de distribución restringida, ya sea altitudinal o latitudinalmente, con un alto grado de endemismo (Peters, 1973).

En el Ecuador existen 25 especies de *Atelopus* formalmente descritas y 7 especies en descripción. En el Ecuador, por lo menos 15 especies del género *Atelopus* se encuentran en

declive poblacional. (Ron, *et al.*, 2012; Ron, *et al.*, 2011). Las especies del género *Atelopus* son terrestres y/o arborícolas y generalmente habitan cerca de riachuelos y ríos. (Lötters, 1996). En el caso de la rana arlequín de Limón (*Atelopus sp.*), los machos defienden los territorios en las orillas del río y llaman la atención de las hembras con fuertes cantos y señales que realizan con sus extremidades (Peña, 2007). En época reproductiva las hembras bajan de las laderas hacia el río para encontrar una pareja. Después de que se produce el amplexus, las parejas se desplazan por la orilla del río durante días o semanas hasta encontrar un lugar adecuado para depositar los huevos. Se han documentado varias ocasiones en las que las parejas se lanzan al río en busca de este lugar (Salazar, 2007).

Puesto que las poblaciones de este género atraviesan procesos de declive, es necesaria la obtención de datos respecto a su biología. Se debe incrementar el conocimiento de este grupo o de lo contrario se podría perder información relevante para la ciencia y para su conservación de manera irreversible (Salazar, 2007). Es importante generar información respecto a los anfibios en peligro de extinción, puesto que existen aspectos de su biología que aún están por investigarse. Con el presente estudio se desea conocer si los aspectos del desarrollo de *Atelopus* son similares a los de la *X. laevis* y otras especies de desarrollo rápido o a los de las especies con desarrollo lento.

En el presente estudio se propone describir los patrones morfológicos del desarrollo embrionario de dos especies de *Atelopus* (*Atelopus elegans* y *Atelopus sp.*) (Anura: Bufonidae). Estos datos serán comparados con los patrones de desarrollo descritos para otras especies (*Gastrotheca riobambae*, *Epipedobates machalilla*, *Xenopus laevis*) (del Pino y Escobar, 1981; del Pino *et al.*, 2004; Nieuwkoop y Faber, 1994). Gracias a esta descripción será posible reconocer los patrones morfológicos del desarrollo temprano de *Atelopus*, con lo

que se aportará al conocimiento escaso que existe respecto a la biología de este grupo. Adicionalmente, esta descripción contribuirá a los estudios comparativos que se llevan a cabo en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 OBTENCIÓN DE EMBRIONES

El Museo de Herpetología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador donó al Laboratorio de Biología del Desarrollo embriones de 2 posturas. La primera donación se realizó el 20 de agosto de 2010, y consistió en una fracción de una postura de *Atelopus sp.* La segunda donación fue una postura completa de *Atelopus elegans*, y se realizó el 7 de junio de 2012. En ambas ocasiones se transfirieron los embriones en cajas Petri con agua libre de cloro.

4.2 MANIPULACIÓN DE EMBRIONES

4.2.1. SOLUCIONES Y TAMPONES

4.2.1.1. PBS (TAMPÓN FOSFATO SALINO)

- 1.5 mM KH_2PO_4
- 7 mM Na_2HPO_4
- 137.7 mM NaCl

4.2.1.2. FIJATIVO SMITH

4.2.1.2.1. SOLUCIÓN A

- 10 gr Dicromato de Potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en 1 L de agua destilada.

4.2.1.2.2. SOLUCIÓN B

- 200 ml de formalina (37 % formaldehído)
- 50 ml Ácido Acético
- 750 ml agua destilada

4.2.2. PROCESAMIENTO DE EMBRIONES

Para la observación de los embriones, se utilizó estereomicroscopios WILD (Heerbrugg) e iluminación con lámparas de fibra óptica KL 1500 (Zeiss). Para la determinación de los tiempos de desarrollo, se fijaron periódicamente varios embriones de cada postura. Para determinar el diámetro y longitud de los embriones, se utilizó un ocular con rejilla graduada, en el estereomicroscopio Carl Zeiss Stemi SV6. Esta medición se realizó en embriones fijados. Todas las observaciones fueron realizadas a temperatura ambiente, dentro del laboratorio (de 18 °C a 23 °C).

Los estadios del desarrollo de *Atelopus sp.* y *Atelopus elegans* fueron adoptados a partir de la comparación de su desarrollo externo con la tabla general del desarrollo de anfibios de Gosner (1960) y la tabla del desarrollo de *Xenopus laevis* (Niewkoop y Faber, 1994).

Embriones de todos los estadios del desarrollo a partir de la blástula fueron fijados para su futura observación, documentación y manipulación. Previo a la incubación en la solución del fijativo, se retiraron las capas de gelatina y la membrana vitelina. Luego del proceso de fijado en las soluciones de Smith (4.3.2.1.), los embriones fueron almacenados en tubos Eppendorf con un número de registro, la fecha y hora de fijación, estadio, y cantidad de embriones fijados.

4.2.2.1. FIJACIÓN EN SOLUCIÓN DE SMITH

Para obtener la solución de fijado se mezcló en partes iguales (1:1) la solución A (4.2.1.2.1.) con la solución B (4.3.1.2.2.). Los embriones fueron incubados en esta solución por 24 horas, a temperatura ambiente, en cajas oscuras de película fotográfica. Posteriormente, se procedió a lavar con agua destilada hasta que se elimine el fijativo. Para finalizar, los embriones fueron almacenados en una mezcla 2:3 de formaldehído 10 % y PBS 1X (4.3.1.1.) a 4 °C hasta ser requeridos.

4.2.2.2. BISECCIONES

Embriones en los estadios deseados, previamente fijados en solución de Smith's (4.1.2.1), fueron embebidos en glicerol y seccionados en su parte media usando un bisturí. Cada una de las mitades fue conservada en una mezcla 2:3 de formaldehído 10% y PBS 1X (4.2.1.1.) a 4° C hasta ser requeridas.

4.2.2.3. SECCIONES DE VIBRATOMO

Embriones previamente fijados en solución de Smith (4.1.2.1) fueron incubados a 45 °C en una solución al 7 % de gelatina en PBS 1X (4.4.1.1.) durante cuatro horas hasta que la gelatina se infiltre en el embrión. Posteriormente, los embriones fueron transferidos a una solución caliente de agarosa al 6 % en PBS 1X (4.4.1.1.) hasta que esta se solidifique. Luego de la solidificación se cortó la porción de agarosa que contenía al embrión. Ésta fue adherida a una base para su posterior seccionamiento en el vibratomo.

Las secciones, de 30 μm de grosor, fueron realizadas en un vibratomo marca Oxford con una cuchilla, a 25° de inclinación, amplitud de 6 y una velocidad de 2.5. Las secciones fueron conservadas en una mezcla 2:3 de formaldehído 10 % y PBS 1X (4.4.1.1.) a 4 °C hasta ser requeridas.

4.2.2.4. TINCIÓN FLUORESCENTE PARA NÚCLEOS CELULARES Y MONTAJE DE PLACAS

El tinte fluorescente Hoechst 33258 fue utilizado para detectar núcleos celulares en las secciones de vibratomo. El tinte Hoechst 33258 se intercala con la doble hélice de ADN, dentro del surco menor (Portugal y Waring, 1988). Las secciones, previamente lavadas en PBS, fueron incubadas por 20 minutos, a temperatura ambiente, en la solución del tinte fluorescente (1 μl de Hoechst 33258 en 1 ml de PBS 1X, 4.4.1.1.). Luego, las secciones fueron lavadas con PBS 1X (4.4.1.1.) una vez cada 10 minutos, por cinco ocasiones y se almacenaron en glicerol. Para el montaje de las secciones en placas, las secciones teñidas fueron transportadas a una gota de glicerol, ubicada en un portaobjetos de cristal, y se colocó un cubreobjetos. Las placas fueron conservadas a -20 °C hasta el momento de su análisis.

4.2.2.5. ANALISIS Y FOTOGRAFÍA DE EMBRIONES ENTEROS, BISECCIONES Y SECCIONES GRUESAS.

Embriones enteros y bisecciones fueron observados y fotografiados utilizando un estéreo-microscopio Carl Zeiss Stemi SV6, al cual se le adaptó una cámara Axiocam, y el programa Axiovision de Zeiss. Las secciones fueron observadas y fotografiadas utilizando

un microscopio Axio Observer Z1 con iluminación para campo claro y microscopía de fluorescencia. Las imágenes digitales fueron analizadas y editadas usando el programa Adobe Photoshop CS5.

5. RESULTADOS

5.1. REPRODUCCIÓN DE *Atelopus sp.* Y *Atelopus elegans*.

Este estudio se basó en el análisis de los embriones de 2 posturas, una de *Atelopus sp.* y una de *Atelopus elegans*. Se obtuvo una parte parte de la postura de *Atelopus sp.* el 10 de agosto de 2010, la postura de *Atelopus elegans* fue obtenida el 7 de junio de 2012. De la postura de *Atelopus sp.* se obtuvo una porción indeterminada, por lo que no se pudo precisar el número total de huevos de la postura. En el caso de la donación de *Atelopus elegans*, se obtuvieron 619 embriones en la postura. Las posturas de ambas especies presentaron huevos depuestos en hileras de gelatina. Los embriones son pequeños y carecen de pigmento (Fig.1). Adicionalmente, se encontró una frecuencia alta de muertes y malformaciones entre los embriones de ambas especies, lo que limitó la disponibilidad del material biológico para la investigación.

5.2. EL DESARROLLO TEMPRANO DE *Atelopus sp.* Y *Atelopus elegans*.

El desarrollo de *Atelopus sp.* (Fig. 2A – G) es similar al de *Atelopus elegans* (Fig. 2H – M). Debido a la limitada cantidad de material biológico obtenido, se explican los estadios del desarrollo de ambas especies de modo conjunto, señalando las características observadas para los embriones de cada especie. Los embriones atravesaron las etapas de blástula (Fig. 3 y 4), gastrulación (Fig. 5, 6 y 7), neurulación (Fig. 8 y 9) y morfogénesis, hasta tomar la forma de renacuajos (Fig. 10 y 11). Las diferencias encontradas, entre el desarrollo de ambas especies, serán anotadas a lo largo de la presente descripción.

La similitud del desarrollo de ambas especies con el desarrollo de otros anuros que poseen reproducción acuática, permitió homologar los estadios del desarrollo embrionario de *Atelopus sp.* y *Atelopus elegans* con estadios establecidos en según la tabla generalizada de Gosner (1960) y la tabla de *Xenopus laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994), desde la fertilización hasta la eclosión de los renacuajos (Tabla 3)..

La Tabla 1 muestra el tiempo, en horas y minutos, que tardaron los embriones en desarrollarse desde la blástula de células medianas hasta un estadio determinado. Se encontró que, a temperatura ambiente, dentro del laboratorio (18 a 23° C), los embriones de *Atelopus sp.* tardan aproximadamente 98 horas en pasar del estadio de 7 hasta el estadio 18. No se obtuvo información para otros estadios de esta especie. Para *Atelopus elegans* se determinó que los embriones tardan 193 horas desde el estadio 8 hasta eclosionar; no se obtuvo información para los estadios más tempranos en especie.

Se observó que los embriones de *Atelopus sp.* son del mismo tamaño que los embriones de *Atelopus elegans*. Debido a la cantidad limitada de posturas utilizadas, estas diferencias no pueden ser probadas estadísticamente. En *Atelopus sp.*, se encontraron embriones en estadio de blástula de estadio 7 un diámetro de 1,4 mm. En *Atelopus elegans*, se encontraron embriones, en estadio 8, con un diámetro similar, de 1,4 mm. El diámetro del huevo podría ser menor en estas especies ya que el blastocele incrementa el diámetro de los embriones y no existen datos de los estadios más tempranos.

5.3. EL PROCESO DE CLIVAJE Y LA BLÁSTULA

5.3.1. BLÁSTULA DE CÉLULAS GRANDES (ESTADIO 7)

Este estadio es el primero que se registró para *Atelopus sp.*, en el caso de *Atelopus elegans*, no se obtuvieron registros. El estadio 7 abarca varias divisiones celulares desde el sexto evento de clivaje. Las sucesivas divisiones celulares reducen el tamaño de las células que componen el embrión. En este estadio, aún se puede apreciar la diferencia de tamaño entre las células del polo animal y las células del polo vegetal (Fig. 3A-B).

Las bisecciones de este estadio mostraron que el blastocele de extensión mediana, y estuvo desplazado hacia la porción animal del embrión. En *Atelopus sp.*, el techo del blastocele mostró pigmento nuclear oscuro dentro de las células próximas al hemisferio animal (Fig. 3C). En los estadios subsiguientes del desarrollo, no se distingue presencia de pigmento en las células.

5.3.2. BLÁSTULA DE CÉLULAS MEDIANAS (ESTADIO 8)

Este estadio es el primero del que se tiene registro para las dos especies. Los embriones de *Atelopus sp.*, en este estadio, presentaron células de un tamaño menor a los embriones del estadio 7. El estadio de células medianas de *Atelopus* es equivalente al estadio 8 de la tabla de Gosner (1960) (Tabla 1). Las secciones sagitales de este estadio permitieron observar al blastocele extendido sobre todo el hemisferio animal (No se muestra). Por otra parte, se observó que el pigmento nuclear era inconspicuo. En *Atelopus elegans* no se distinguió la presencia de pigmento interno.

5.3.3. BLÁSTULA DE CÉLULAS PEQUEÑAS (ESTADIO 9)

Los embriones de este *Atelopus elegans* de este estadio presentaron células de menor tamaño y una apariencia homogénea (Fig. 4A). Se observó que las células del polo vegetal del embrión poseían un tamaño mayor al resto de células. Para *Atelopus sp.*, se registró un tiempo de 9 horas desde el estadio 7, para *Atelopus elegans*, 3,6 horas desde el estadio 8. La morfología interna de los embriones de *Atelopus sp.* reveló una prolongación lateral de la región vegetal hacia el techo del blastocele (Fig 4D).

5.4. MORFOLOGÍA DEL PROCESO DE GASTRULACIÓN (ESTADIOS DEL 10 AL 13).

5.4.1. LABIO DORSAL DEL BLASTOPORO (ESTADIO 10)

El inicio de la gastrulación está marcado por la formación del labio dorsal del blastoporo. En ambas especies, el labio dorsal se formó como una hendidura curva en la región sub-ecuatorial del embrión (Fig. 5A-B). Esta hendidura progresa hasta formar un surco semicircular (estadio 10,5) que empieza a rodear a las células vegetales. No se observó pigmentación externa. Para *Atelopus sp.*, se registró un tiempo de 11,5 horas desde la fertilización.

Morfología interna: Las secciones del estadio 10 muestran al blastocele expandido sobre todo el hemisferio animal. En la región dorsal – vegetal, producto de la invaginación de las células en el labio dorsal, se observó una hendidura que corresponde al labio dorsal del

blastoporo, y se observó el arquenterón en formación. Se observaron células en botella en el vértice interno del arquenterón (Fig. 5C-E).

5.4.2. EMBRIÓN CON TAPÓN DE YEMA GRANDE (ESTADIO 11).

En el estadio 11 se formó el tapón de yema, producto del avance del labio dorsal del blastoporo hacia la región ventral (Fig. 6A –B). El tapón de yema contiene a las células vegetales que, por los movimientos de gastrulación, se internalizan. Para *Atelopus sp.*, se registró un tiempo de 39 horas desde el estadio 7 hasta el estadio 11.

5.4.3. EMBRIÓN CON TAPÓN DE YEMA PEQUEÑO (ESTADIO 12,5).

El tapón de yema, en este estadio, mostró un diámetro menor (Fig. 7A-B). Para *Atelopus sp.*, se registró un tiempo de 72,83 horas desde el estadio 7.

Morfología interna: La sección mostrada en la Figura 7D presenta un blastocele de tamaño menor, en relación al estadio 10. Se observó que las células de la zona vegetal recubren gran parte del techo del blastocele y reducen la superficie expuesta de la bicapa de células del techo (Fig. 7E). Un tabique de células, con varios espacios internos, separa al blastocele del arquenterón. Se consideró como ectodermo a la capa superficial del techo del arquenterón y como endo-mesodermo a la capa interna, en contacto con el arquenterón.

5.4.4. POST-GÁSTRULA (ESTADIO 13)

El cerramiento del blastoporo, por la convergencia de los labios, determinó el fin de la gastrulación (Fig. 8A). Se observó el surco neural, que nace del blastoporo y recorre la línea

media dorsal. En embriones de *Atelopus sp.*, se observó que el blastoporo se cierra. No fue posible observar la placa neural en este estadio. Para *Atelopus sp.*, se registró un tiempo de 24,7 horas desde la fertilización hasta el estadio 13.

Morfología interna: Se observó el alargamiento de la porción ventral del arquenterón. Adicionalmente se reconoció el neuroectodermo sensorial en la región más rostral del techo del arquenterón (Fig. 8D).

5.5. MORFOLOGÍA DE LA NÉURULA (ESTADIOS 15 y 16)

5.5.1. NÉURULA MEDIA (ESTADIO 15)

Para *Atelopus elegans*, en el estadio 15 se observó al surco neural pronunciado, con la forma de un canal, producto de la elevación y acercamiento de los pliegues neurales (Fig. 9A). Para *Atelopus elegans*, se registró un tiempo de 66 horas desde el estadio 8 hasta el estadio 15.

Morfología interna: En secciones transversales, se observó presencia del notocordio y del mesodermo paraxial. Para este estadio se encontró al endodermo recubrir la totalidad del techo del arquenterón, excepto en la porción inferior al notocordio (Fig. 9C).

5.5.2. NÉURULA TARDÍA (ESTADIO 16)

La fusión de los pliegues neurales y la formación del tubo neural marcan el fin de la neurulación (Fig. 10A-D). Para *Atelopus sp.*, durante este estadio, se elongó el cuerpo a lo largo del eje antero-posterior. El tubo neural se forma medialmente hacia los extremos rostral

y caudal. Todavía no son distinguibles en este estadio estructuras especializadas. Más adelante en este estadio, para *Atelopus elegans*, se distinguen las yemas de las glándulas adhesivas (Fig. 10D). Para *Atelopus elegans*, la forma avanzada de este estadio se registró con un tiempo de 72 horas desde el estadio 7.

Morfología interna: La sección de *Atelopus elegans*., resultado de un corte transversal, permitió observar, somitas segmentados, al mesodermo presomítico, el tubo neural y el notocordio. El tubo neural se formó por la internalización del surco neural.

5.6. MORFOLOGÍA DE LOS ESTADIOS DE RESPUESTA MUSCULAR COLA Y ECLOSIÓN (ESTADIOS 19 Y 21)

5.6.1. RESPUESTA MUSCULAR (ESTADIO 18)

La forma de los embriones, el desarrollo de la de la cola y la respuesta muscular de los embriones a estímulos caracterizan a este estadio. Los embriones poseen una forma elongada, englobando la masa endodermal de yema. (Fig. 11A-B). En la cabeza, los arcos branquiales son inconspicuos. Se observaron las vesículas óptica y ótica. Se observó la presencia de los somitas de la cola. Se registró un tiempo de 98 horas desde el estadio 7 en *Atelopus sp.*, y de 99 horas desde el estadio 8 en *Atelopus elegans*.

5.6.2. EL EMBRIÓN A LA ECLOSIÓN (ESTADIO 21)

Los embriones de *Atelopus elegans* iniciaron su etapa de vida libre desde este estadio. La características distintivas principal de los embriones son la aparición de pigmento en la región dorsal, el desarrollo de la boca y el opérculo cubriendo las branquias. Las glándulas adhesivas son persistentes en el lado ventral, posteriores a la boca (Fig. 12A-B).

6. DISCUSIÓN

6.1. EL DESARROLLO DE *Atelopus sp.* Y *Atelopus elegans*.

No existen registros sobre el desarrollo temprano de las ranas del género *Atelopus*. Debido a esto, es importante homologar el desarrollo de *Atelopus sp.* y *Atelopus elegans* con los estadios generalizados reconocidos desde la fecundación hasta la eclosión de los renacuajos con otras especies. Con esto se consigue facilitar la descripción del desarrollo embrionario temprano y el uso de especies de *Atelopus* en el laboratorio. El número de estadios del desarrollo descritos para *Atelopus* en este estudio ha estado limitado por el material biológico disponible y la fragilidad del mismo. Sin embargo, las observaciones realizadas permiten reconocer los cambios morfológicos externos que atraviesan los embriones de *Atelopus sp.* y *Atelopus elegans* durante el desarrollo y permiten la comparación con otras tablas del desarrollo (Tabla 1). La homologación de los estadios del desarrollo temprano de *Atelopus sp.* y *Atelopus elegans* con los estadios propuestos en la tabla del desarrollo de *X. laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994) facilita el uso de esta especie en estudios de Biología del Desarrollo y permite la comparación de los resultados obtenidos con el conocimiento generado a partir del estudio de *X. laevis*, y con la tabla generalizada de Gosner (1960) (Anexos 3 y 4). A partir de las observaciones en cuanto a la tasa de desarrollo y la morfología de la gástrula, se propone que los embriones de *Atelopus* poseen un desarrollo rápido, similar al de la rana modelo del desarrollo *X. laevis*.

La forma elongada de los embriones de *Atelopus sp.* y *Atelopus elegans* durante los estadios de néurula y organogénesis, englobando al endodermo en el estadio de yema de la cola (Fig. 23A y 24A), es similar a la forma alargada de que adquieren los embriones de *X.*

laevis (Nieuwkoop y Faber, 1994). Se observó que la ausencia de branquias externas influye en la homologación identificación de los estadios 19 al 23 en estas especies. Los tiempos de desarrollo no fueron medidos bajo una temperatura constante (intervalo de 18 a 23° C). La alta variabilidad de los datos de duración indica el poco control que se tuvo sobre las variables que influyen la velocidad del desarrollo. La tasa del desarrollo depende en gran medida de la temperatura (revisado por Duellman y Trueb, 1994). Por este motivo, se sugiere la realización de experimentos controlados, en los que se incuben las posturas a temperaturas constantes, para demostrar de qué forma afecta la temperatura al desarrollo de estas especies. Los tiempos de desarrollo proporcionados en la Tabla 2 representan el producto de las observaciones a lo largo de esta investigación, y no puede determinarse su exactitud, tanto por el tamaño de las muestras analizadas, como por la falta de observación constante en el desarrollo. Se sugiere la realización de experimentos en los que se controle amplíe estos factores y que permitan compararse estadísticamente los tiempos de desarrollo y tamaños de estas especies.

El Anexo 2 es una recopilación de los datos en la literatura obtenidos, a partir de la revisión bibliográfica, que ponen en perspectiva el tamaño aproximado del huevo de *Atelopus sp.* y *Atelopus elegans*. De acuerdo a Duellman y Trueb (1994) el tamaño de huevo en los anuros varía desde los 0,75 mm, hasta los 12 mm. En relación, se considera que *Atelopus sp.* y *Atelopus elegans* poseen un tamaño de huevo relativamente pequeño.

6.2. LOS ESTADIOS DE CLIVAJE Y BLASTULA EN COMPARACIÓN CON OTROS ANFIBIOS.

El proceso de clivaje, en estas especies, presumiblemente es holoblástico y sincrónico; es decir, que los embriones forman siempre un número par de células luego de cada evento de división celular. La forma de la blástula es común para la mayoría de anfibios, con un blastocele desplazado hacia el polo animal (Fig. 3 y 4).

6.3. EL MODO DE GASTRULACIÓN DE *Atelopus sp.* Y *Atelopus elegans* EN COMPARACIÓN CON OTRAS ESPECIES DE ANUROS

La morfología, tanto externa como interna, descrita para los estadios de gastrulación, permitió distinguir la acción de los movimientos morfogenéticos que actúan durante este proceso (Fig. 4D, 5). Estos movimientos son indicadores de la inducción mesodermal ya que los procesos moleculares de inducción están íntimamente ligados al control del comportamiento celular de las células inducidas (Symes y Smith, 1987).

El factor más importante para la internalización del endodermo y mesodermo es el movimiento de rotación vegetal (Winklbauer y Schürfeld, 1999). En la Figura 4C se observa el efecto de este movimiento sobre las células del piso del blastocele. El Cleft de Brachet es la separación entre la masa de células vegetales internas y la capa de células superficiales, en la zona dorsal de esta sección, y se forma cuando el movimiento de rotación vegetal empuja a las células vegetales del piso del blastocele hacia el techo del mismo (Anexo 1). El Cleft de Brachet es una evidencia del proceso de involución de la zona marginal, que contiene al mesodermo y endodermo prospectivo. El Cleft de Brachet también evidencia un cambio

cualitativo celular que impide la fusión entre los grupos de células que ingresan por involución y la zona marginal que no involuciona (Keller y Shook, 2003).

Los procesos de rotación vegetal continúan a la par de la formación del labio dorsal del blastoporo y el tapón de yema; es decir, se inician en el lado dorsal y se expanden hacia los lados, convergiendo en la región ventral (revisado por Keller y Shook, 2003). La presencia del Cleft de Brachet en los embriones de *Atelopus* indica que los procesos morfogenéticos de rotación vegetal deben ocurrir en los embriones de estas ranas, al igual que en *X. laevis*.

El labio dorsal del blastoporo se forma en la región subecuatorial de la blástula de *Atelopus sp.* y *Atelopus elegans* (Fig. 5). El labio dorsal del blastoporo se forma por invaginación de la capa epitelial, en el borde interior dorsal de la zona marginal de involución (Wolpert, 2007). Como se observa en la Figura 5D, las células del vértice interno del arquenterón presentan la forma característica de las células en botella. Este cambio de morfológico es producido por la constricción apical de las células que forman el labio dorsal del blastoporo y es el responsable del inicio en la involución (Keller y Shook, 2003).

El proceso de reducción del número de capas de células que conforman el techo del blastocele está guiado por el movimiento de epíbole (revisado por Gilbert, 2003). Se observó que en *Atelopus sp.*, el techo del blastocele llega a tener un grosor de dos capas celulares, al igual que en *X. laevis*. El movimiento de epíbole es generado por la intercalación radial de las células del techo, lo que reduce el número de células y amplía la superficie de la capa que no involuciona (revisado por Keller y Shook, 2003).

Se observó que la inflación y la elongación del arquenterón son eventos ocurren de manera relativamente simultánea, y temprano en la gastrulación de *Atelopus* (Fig. 9A, 10B y 11B) y finalizan antes del cerramiento del blastoporo (Fig. 13B y 14B). La inflación del

arquenterón, al parecer, es el resultado del influjo de líquido proveniente del blastocele (Ewald *et al.* 2004). Las cavidades en el tabique, que separan al arquenterón del blastocele, observadas en la sección de gástrula avanzada de *Atelopus sp.*, son comunicaciones que permiten este flujo y la correspondiente desaparición del blastocele. El proceso de reducción del blastocele transcurre simultáneamente a la inflación del arquenterón. El blastocele desaparece, casi por completo, en la transición hacia la gástrula tardía (Ewald *et al.*, 2004).

Se sugiere que hubo extensión convergente durante la gastrulación. Se ha observado que el establecimiento del mesodermo paraxial y notocordio está íntimamente ligado con los movimientos morfogenéticos de convergencia y extensión que ocurren durante gastrulación en *X. laevis* (revisado en Pourquié, 2001).

El cerramiento del blastoporo es el resultado o la suma de los movimientos más importantes durante la gastrulación: la convergencia y extensión dorsal y la rotación vegetal, que generan involución. Otros movimientos menos estudiados, como la convergencia y engrosamiento, que ocurre en las especies de desarrollo lento y en el labio ventral del blastoporo, podrían estar implicados también en este proceso (Ewald *et al.* 2004).

A partir los estudios desarrollados con otras especies de anuros que difieren en sus estrategias reproductivas, se logró determinar la existencia de varios patrones de gastrulación, posiblemente relacionados a los modos y adaptaciones reproductivas que presentan estas especies (Moya *et al.*, 2007; del Pino *et al.*, 2007). El primer patrón de gastrulación estaría representado por *X. laevis* y demás ranas de desarrollo rápido, como *Engystomops randi* y *Engystomops coloradorum*. Estas especies poseen huevos de un diámetro pequeño y un modo de reproducción acuático o similar, que incita a la eclosión rápida de las larvas. El Anexo 2 permite la comparación entre los tiempos de gastrulación de diversos anfibios. En estas

especies la elongación del arquenterón y el notocordio se inician entre la gástrula temprana y media y terminan con el cerramiento del blastoporo (Moya *et al.* 2007; del Pino *et al.* 2007). En el género *Atelopus*, el tamaño del huevo, el modo reproductivo, y la morfología interna de la gástrula y posgástrula; sugieren que su desarrollo coincide con este patrón.

El segundo patrón incluye a *C. machalilla* y a otros dendrobátidos. *Colostethus machalilla* produce huevos de 1,6 mm que son abandonados al cuidado del padre, sobre la tierra u hojarasca (del Pino *et al.*, 2004). En estas especies, la elongación del arquenterón se inicia de forma ligeramente más tardía, en la gástrula media; mientras que el alargamiento del notocordio inicia en la post-gástrula. del Pino y colaboradores (2007) demostraron, a partir del análisis de la gastrulación en dendrobátidos con diferentes tamaños de huevo, que este factor no influyó en el inicio de la elongación del arquenterón. En cuanto a *Gastrotheca riobambae*, sus patrones de desarrollo incluyen al modo más divergente de gastrulación. Esta rana produce huevos grandes (3 mm), numerosos y de desarrollo lento, que son incubados en una bolsa, en la espalda de la madre, hasta ser liberados como renacuajos. El desarrollo tarda 14 días desde la fertilización hasta el cerramiento del blastoporo (del Pino, 1989). En esta especie, la elongación del notocordio y la expansión del arquenterón son eventos que se inician luego del cerramiento del blastoporo. Además, esta es la única especie que forma un disco embriónico. En *G. riobambae*, antes de la formación de los labios del blastoporo, se forma el aro blastoporal, una depresión en forma de anillo que delimita el futuro tapón de yema. En la zona dorsal del aro blastoporal se forman células en botella. El análisis comparativo de la gástrula de esta especie concluye que la involución es el evento representativo de la gastrulación, y que la convergencia y extensión dorsal puede separarse de la gastrulación (Moya *et al.*, 2007; del Pino *et al.*, 2007; Elinson y del Pino, 2012).

Debido a las variaciones encontradas en los patrones de gastrulación, varios autores han concluido que el proceso de gastrulación en los anfibios debe cumplir con dos metas principales, el cerramiento del blastoporo, que lleva al mesodermo y endodermo hacia la parte interna del embrión, y la formación del arquenterón (Ewald *et al.*, 2004). En el caso de la convergencia y extensión, su anticipación estaría asociada con el modo reproductivo de las especies con desarrollo rápido. El estudio de especies divergentes como *C. machalilla*, *E. coqui* o *G. riobambae* proveen evidencia de los efectos de las adaptaciones reproductivas sobre el desarrollo de los embriones (del Pino *et al.* 2004).

6.4. LA ESTRATEGIA REPRODUCTIVA DE LAS RANAS DEL GÉNERO *Atelopus* EN RELACIÓN A SU DESARROLLO

Las ranas del género *Atelopus* presentan un modo reproductivo acuático y ovipositan huevos numerosos en cada postura. Acordemente, las presiones selectivas sobre los procesos del desarrollo probablemente se encuentren inclinadas hacia un desarrollo rápido. Las velocidades de gastrulación descritas para especies con modos reproductivos acuáticos concuerdan con esta hipótesis.

Tanto larvas como posturas de *Atelopus*, son muy difíciles de hallar en la naturaleza. Esto se debe a que las ranas de este grupo escogen lugares crípticos para ovipositar. Las características del desarrollo de *Atelopus sp.* y de *Atelopus elegans* son consistentes con posibles adaptaciones a este comportamiento. Un ejemplo importante de esto es la pigmentación de los huevos. Esta es una característica frecuente entre los anfibios, pues se considera que el pigmento en el hemisferio animal del huevo proporciona protección al ADN

contra la radiación UV. Adicionalmente, en las especies que presentan esta característica, el hemisferio superior oscuro del huevo podría servir como camuflaje contra predadores terrestres, mientras que el hemisferio vegetal claro haría lo mismo contra predadores acuáticos. En contraste, los huevos y embriones no están pigmentados en el caso de ranas que se desarrollan en locaciones reclusas (Duellman y Trueb, 1986). La localización críptica de las posturas de *Atelopus* habría eliminado cualquier presión selectiva positiva sobre el carácter de pigmentación en el huevo. Sin embargo, una vez que el renacuajo maduro eclosiona, este carácter vuelve a adquirir valor adaptativo como camuflaje, por lo que la epidermis de la larva se pigmenta en estadios avanzados.

Los embriones de *Atelopus sp.* presentaron un grado de pigmentación menor al de las ranas del género *Engystomops* y *X. laevis* (Romero-Carvajal *et al.*, 2009; Nieuwkoop y Faber, 1994). Esto posiblemente está asociado a los modos reproductivos, especialmente en cuanto a la ubicación de las posturas y su exposición a la luz solar. El carácter de la presencia de gránulos de pigmento en *Atelopus* merece investigarse a nivel molecular, ya que Shroom2, un regulador de la γ -tubulina, posee un rol esencial en la inducción de gránulos de pigmento en los oocitos y blastómeros de *X. laevis* (Lee *et al.*, 2009). En contraste a *X. laevis*, los huevos y los embriones tempranos de *Physalaemus pustulosus* (Leiuperidae) son blancos, y la cantidad de ARN materno de *Shroom2* es muy bajo en comparación a *X. laevis* (Lee *et al.*, 2009; Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Acordemente, la pigmentación de los huevos en otras ranas posiblemente depende de los niveles de expresión de *Shroom2* en la oogénesis (Lee *et al.*, 2009).

Otro carácter del desarrollo de *Atelopus* que probablemente juega un rol adaptativo particular para su entorno es la glándula adhesiva pronunciada. Las células de la glándula

adhesiva, también denominada glándula de cemento, tienen origen ectodermal y excretan una mucosa que le permite al embrión eclosionado adherirse a un soporte estable (Pshennikova y Voronina, 2010). Presumiblemente, esta estructura satisface la necesidad de la larva de *Atelopus* de aferrarse a superficies estables en un ambiente de agua en movimiento. Eventualmente, los renacuajos desarrollan grandes copas sutoriales ventrales que satisfacen esta necesidad (Starret, 1967). Esto, junto a la proyección ventral de la boca, concuerda con la adaptación a una vida bentónica de la larva (Anexo 5).

Se recomienda realizar estudios adicionales a la menor brevedad en el desarrollo del género *Atelopus*, debido a que los declives en las poblaciones de este grupo pueden comprometer la posibilidad de realizar futuras investigaciones. La naturaleza reproductiva de este género involucra posturas acuáticas con huevos numerosos y desarrollo rápido. Sin embargo, la reproducción en cautiverio presenta dificultades en cuanto a la cantidad de posturas potencialmente disponibles y a los requerimientos de los adultos para su cría. En el futuro, la exploración de la biología de *Atelopus* podría ofrecer descubrimientos clave para la conservación de este género, y del desarrollo en los anfibios.

7. LITERATURA CITADA

Boistel, R. S., Grosjean, S., Lötters, S. 2005. Tadpole of *Atelopus franciscus* from French Guyana with comments on other larvae of the genus (Anura: Bufonidae). *Journal of Herpetology* 39(1): 148-153.

Browder, L. e Iten, L. 1998. *Xenopus* as a Model System in Developmental Biology. [en línea]. (marzo 4, 1998) Dynamic development. <<http://www.acs.ucalgary.ca/~browder/frogsrus.html>> [consulta: 1 diciembre, 2012].

Browder, L. W. 1984. *Developmental Biology*. Saunders College Press. Philadelphia.

Cebra-Thomas, J. 2004. *Experiments in Developmental Biology*. [en línea] (Enero 20, 2003) Swarthmore College. <http://www.swarthmore.edu/NatSci/sgilber1/DB_lab/Frog/frog_staging.html> [consulta: 20 mayo, 2013].

del Pino, E. M. 1996. The expression of Brachyury (T) during gastrulation in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. *Developmental Biology* 177: 64–72.

del Pino, E. M., Avila, M–E., Pérez, O. D, Benitez, M. S, Alarcón, I., Noboa, V. y Moya, I. 2004. Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *Developmental Biology* 48: 663–670.

del Pino, E. M. y Escobar, B. 1981. Embryonic Stages of *Gastrotheca riobambae* (Fowler) during maternal incubation and comparison of development with that other egg-brooding hylid frogs. *Journal of Morphology*. 167: 277 – 295.

del Pino, E.M., Venegas-Ferrín, M., Romero-Carvajal, A., Montenegro-Larrea, P., Sáenz-Ponce, N., Moya, I. M., Alarcón, I., *et al.* 2007. A comparative analysis of frog early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(29): 11882–11888.

Duellman, W. E. y Lynch, J. D. 1969. Descriptions of *Atelopus* tadpoles and their relevance to atelopodid classification. *Herpetologica* 25:231-240.

Duellman, W. y Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians: Reproductive strategies*. McGraw Hill Book Company. New York.

Elinson, R. P. y del Pino, E. M. 2012. *Developmental diversity of amphibians*. Wiley Interdisciplinary Reviews: *Developmental Biology* n/a-n/a. doi:10.1002/wdev.23

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

Frost, D. R. 2011. Amphibian Species of the World. [en línea]. Versión 3.0 (11 Enero, 2011). American Museum of Natural History, New York, USA. <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/references.index>> [consulta: 17 abril, 2012].

Giaretta, A. y Menin, M. 2004. Reproduction, phenology and mortality sources of a species of *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae). *Journal of Natural History*. 38 (13): 1711-1722.

Gilbert. S. F. 2009. *Developmental Biology*. Seventh Edition. Sinauer Associates, Inc.. Sunderland, Massachusetts.

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

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

Karp, G., Berrill, N. J. 1981. *Development*, McGraw-Hill Book Company, New York.

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

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

Keller, R. E. 1976. Vital dye mapping of the gastrula and neurula of *Xenopus laevis*: II.

Prospective areas and morphogenetic movements of the deep layer. *Developmental*

Biology 51(1): 118–137.

Lee C., Le M. P., Cannatella D., Wallingford J. B. 2009. Changes in localization and expression levels of Shroom2 and spectrin contribute to variation in amphibian egg pigmentation patterns. *Dev. Genes Evol.* 219:319-330.

Lötters, S. 1996. The Neotropical toad Genus *Atelopus*. Checklist-Biology-Distribution.

Vences, M. and Glaw, F. Verlags GbR. Köln, Germany 1-143.

Michael, P. 1981. A Normal table of early development in *Bombina orientalis* (Boulenger), in relation to rearing temperature. *Develop., Growth and Differ.* 23(2): 149-155.

Moya, I. M., Alarcón, I., y del Pino, E. M. 2007. Gastrulation of *Gastrotheca riobambae* in comparison with other frogs. *Developmental Biology* 304(2): 467–478.

Newport, J.W. y Kirschner, M. W. 1982. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos. II. Control of the onset of transcription. *Cell* 30: 687-696.

Niehrs C. 2004. Regionally specific induction by the Spemann-Mangold organizer. *Nat Rev Genet.* 5:425-434.

Nieuwkoop, P. D. y Faber, J. 1994. Xenbase: a *Xenopus* web resource. *Xenopus laevis* stage series. [en línea]. (Junio 20, 2003) Garland Publishing Inc, New York <<http://www.xenbase.org/atlas/NF/NF1-10.html>> [consulta: 1 diciembre, 2012].

Peña -L., P. 2007. Períodos de actividad, comunicación y aspectos de historia natural de una de las últimas ranas arlequín (Bufonidae: *Atelopus*) del Ecuador. Disertación de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Peters, J. A., 1973. The Frog Genus *Atelopus* in Ecuador (Anura: Bufonidae), Smithsonian Institute Press, Washington.

Pourquié, O. 2001. Vertebrate Somitogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001. 17:311-350.

Pshenikova E. S., Voronina, A. S. 2010. Cement Gland as the Adhesion Organ in *Xenopus laevis* Embryos. *Russian Journal of Developmental Biology.* 43: 3-13.

Portugal, J., Waring, M. J. 1988. Assignment of DNA binding sites for 4',6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study. *Biochimica et Biophysica Acta* 949: 158-68.

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

Ron, S. R., Coloma, L. A., Guayasamin, J. M. y Yanez-Muñoz, M. H. 2012. *AmphibiaWebEcuador*. [en línea] Version 2012.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

<<http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios/AnfibiosEcuador>> [consulta: 17 noviembre 2012]

Ron, S. R., Guayasamin, J. M., Menéndez-Guerrero, P. 2011. Biodiversity and Conservation Status of Ecuadorian Amphibians. En: Heatwole, H, Barrio-Amoros C. L., y Wilkinson, H. W. 2011. *Amphibian Biology*, Volume 9, Part 2. Pp. 129-170. Surrey Beatty y Soons PTY Limited, Baulkham Hills, Australia.

Salazar -V., D. 2007. Demografía e historia natural de una de las últimas ranas arlequín (*Bufo* spp.: *Atelopus*) del Ecuador. Disertación de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

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

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

Starrett, P. 1967. Observations on the life history of frogs of the family Atelopodidae. *Herpetologica* 23: 195-204.

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

Tada, M. y Smith, J. C. 2001. T-targets: Clues to understanding the functions of T-box proteins. *Develop. Growth Differ.* 43: 1–11.

Taira, M., Jamrich, M., Good, P. J. and Dawid, I. B. 1992. The LIM domain-containing homeo box gene *Xlim-1* is expressed specifically in the organizer region of *Xenopus* gastrula embryos. *Genes Dev.* 6: 356 -366.

Townsend, D. S. and Stewart, M. M. 1985. Direct development in *Eleutherodactylus coqui* (Anura: Leptodactylidae): a staging table. *Copeia* 2: 423-423.

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

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

Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T., Lawrence, P. y Meyerowitz, E. 2007. *Principles of Development*. Current Biology Ltd. Oxford University Press. London, New York.

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

Zaracho, V. H., Céspedes, J. A. y Álvarez, B. B. 2003. Caracterización de las puestas de dos especies del género *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae), en Corrientes, Argentina. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.

ontogenies, and the evolution of body form. *Animal Biology*. 53 (3): 209 – 223.

LISTA DE ABREVIATURAS

a:	Arquenterón	ty:	Tapón de yema
ac:	Aleta de la cola	vo:	Vesícula óptica
b:	Blastocele	vot:	Vesícula ótica
bp:	Blastoporo	y:	Yema
br:	Branquias	yc:	Yema de la cola
cs:	Capa sensorial del neuroectodermo		
ec:	Ectodermo		
em:	Endomesodermo		
en:	Endodermo		
g:	Gelatina		
ga:	Glándula adhesiva		
ld:	Labio dorsal del blastoporo		
lv:	Labio ventral del blastoporo		
m:	Mesodermo		
n:	Notocordio		
o:	Ojo		
pln:	Pliegues neurales		
pn:	Placa neural		
s:	Somita		
sn:	Surco neural		
so:	Estomodeo		
tn:	Tubo neural		

8. FIGURAS

Fig. 1.

Figura 1. Una postura de *Atelopus elegans*: Los embriones se encuentran estadio de blástula media (estadio 8). La barra corresponde a 2 mm.

Fig. 2.

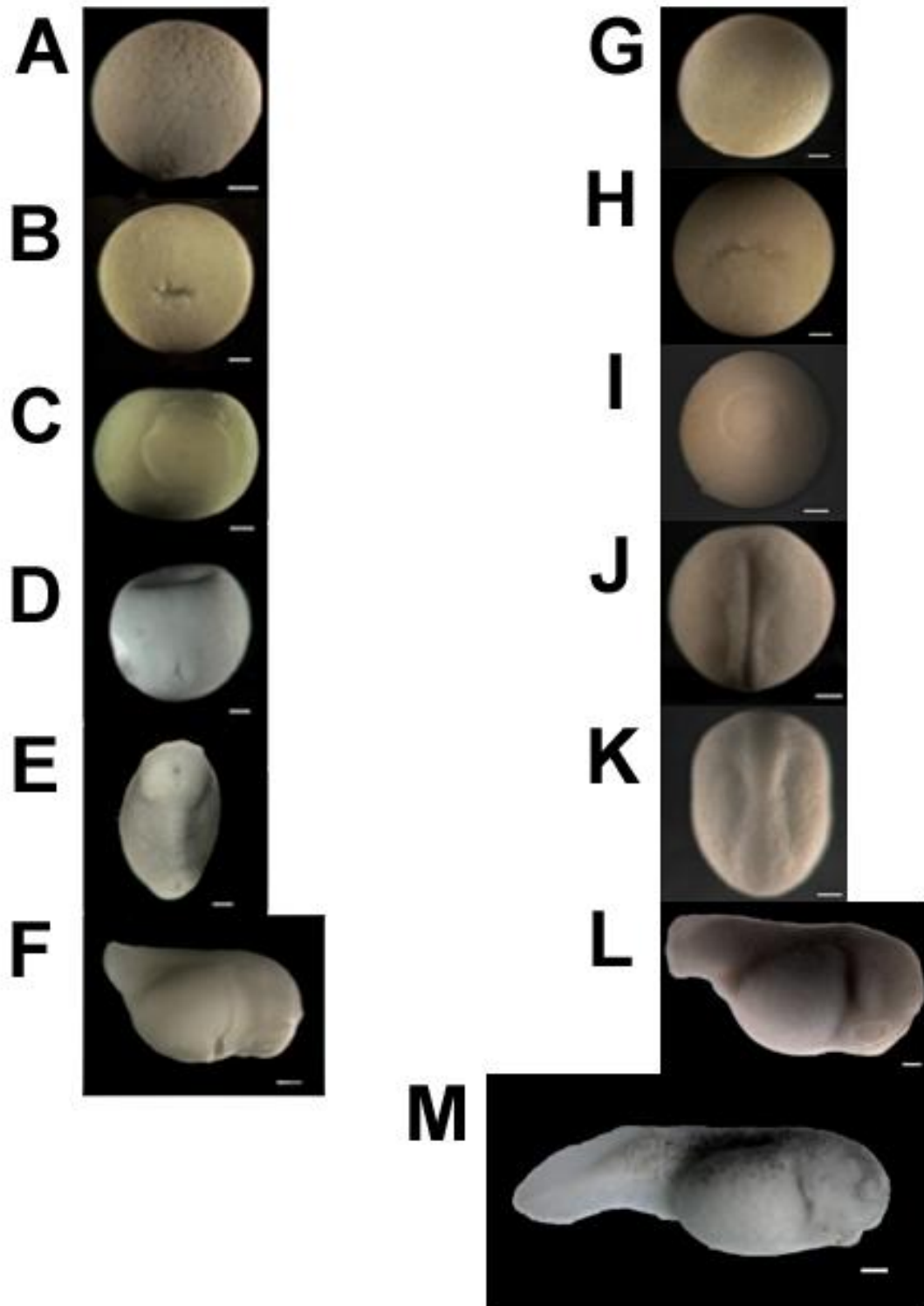
*Atelopus sp.**Atelopus elegans*

Figura 2. Resumen del desarrollo temprano de *Atelopus sp.* y *Atelopus elegans*. A, F, G, L y M son vistas laterales. C, D, E, H, I, J y K son vistas dorsales. Las imágenes A-F resumen el desarrollo de *Atelopus sp.*, usando estadios representativos obtenidos. Las imágenes G-M presentan los estadios representativos obtenidos de *Atelopus elegans*. (A y G) Blástula. (B y H) Gástrula temprana, (C e I) Gástrula tardía, (D) Post-gástrula. (E, J y K) Néurula. (F y L) Estadio de yema de la cola. (M) Estadio a la eclosión de *Atelopus elegans*. Las barras en todas las imágenes corresponden a 200 μm .

Fig. 3.

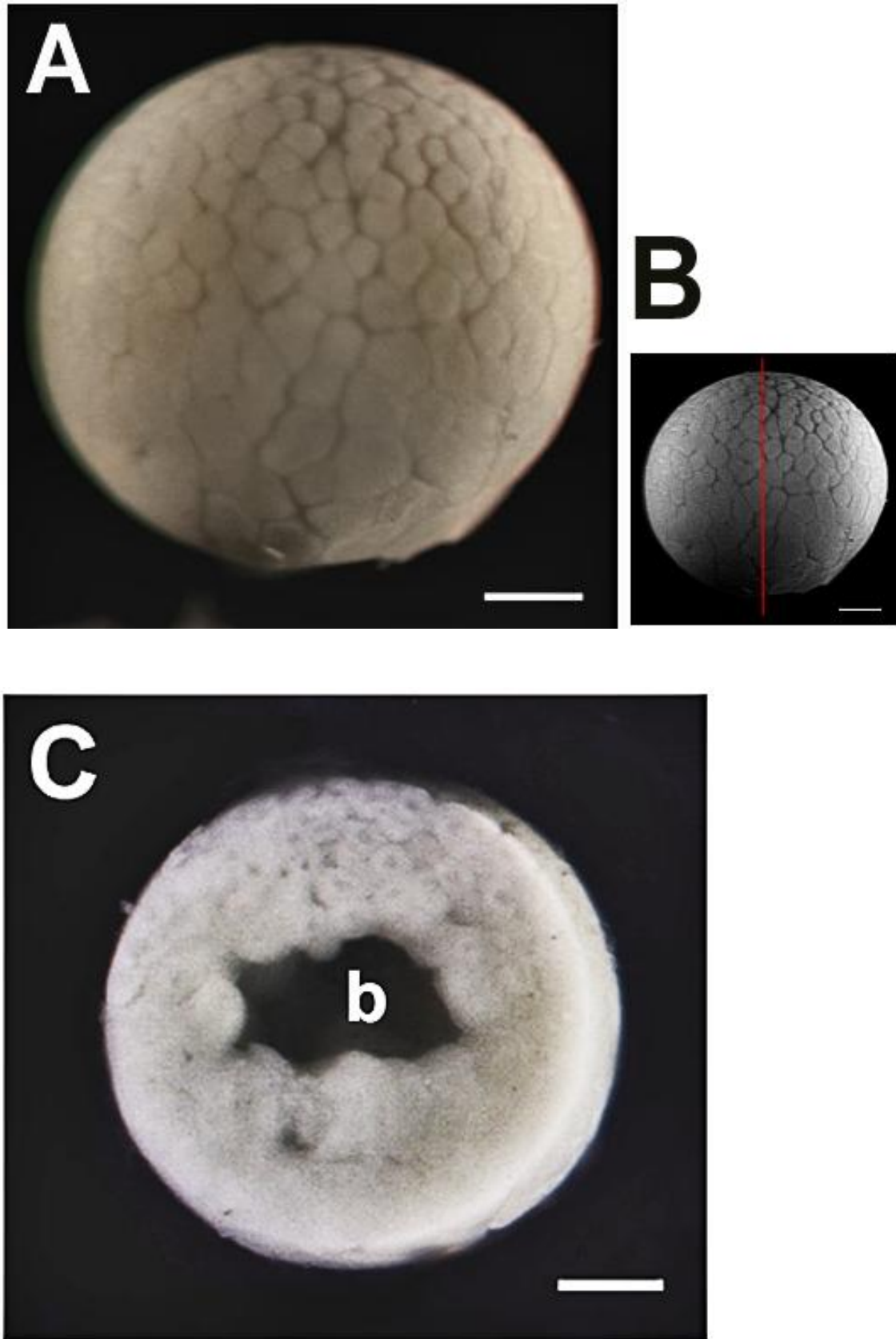


Figura 3. Morfología del estadio de blástula de células medianas de *Atelopus sp.*(estadio 7): (A) Vista lateral, con el hemisferio animal orientado hacia arriba. Blástula de células medianas de *Atelopus sp.* (B) La misma imagen que se muestra en A, que muestra la orientación de la sección sagital en C. (C) Sección sagital que muestra la diferencia de tamaños celulares entre las regiones animal y vegetal, y el blastocele.

Fig. 4.

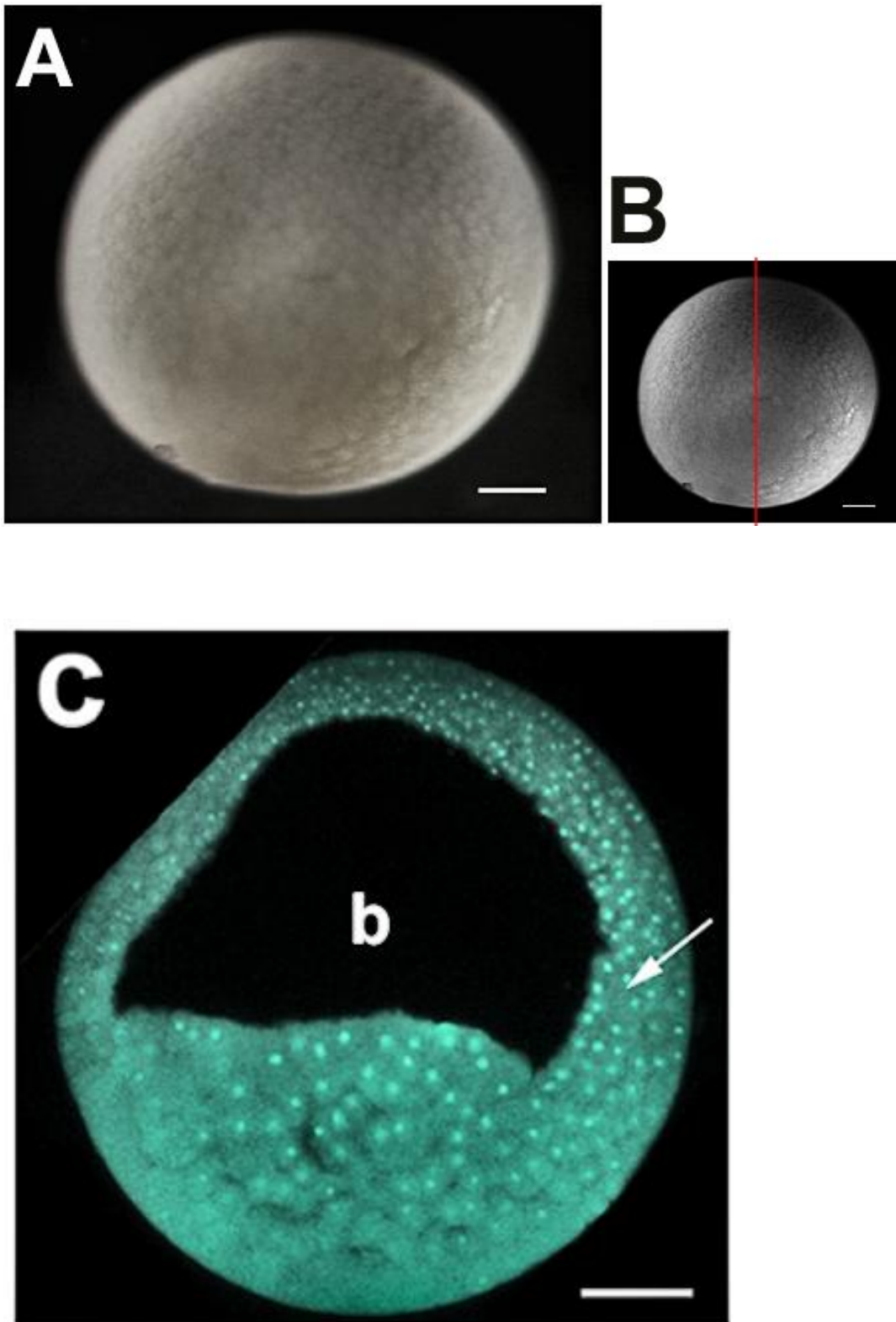


Figura 4. Morfología del estadio de blástula de células pequeñas de *Atelopus elegans* (estadio 9): (A) Vista lateral, con el hemisferio animal orientado hacia arriba. Blástula de células pequeñas. (B) La misma imagen que se muestra en A, que muestra la orientación de la sección sagital en C. (C) Tinción de fluorescencia nuclear aplicada a una sección sagital. La flecha señala el Cleft de Brachet. Las barras corresponden a 200 μm .

Fig. 5.

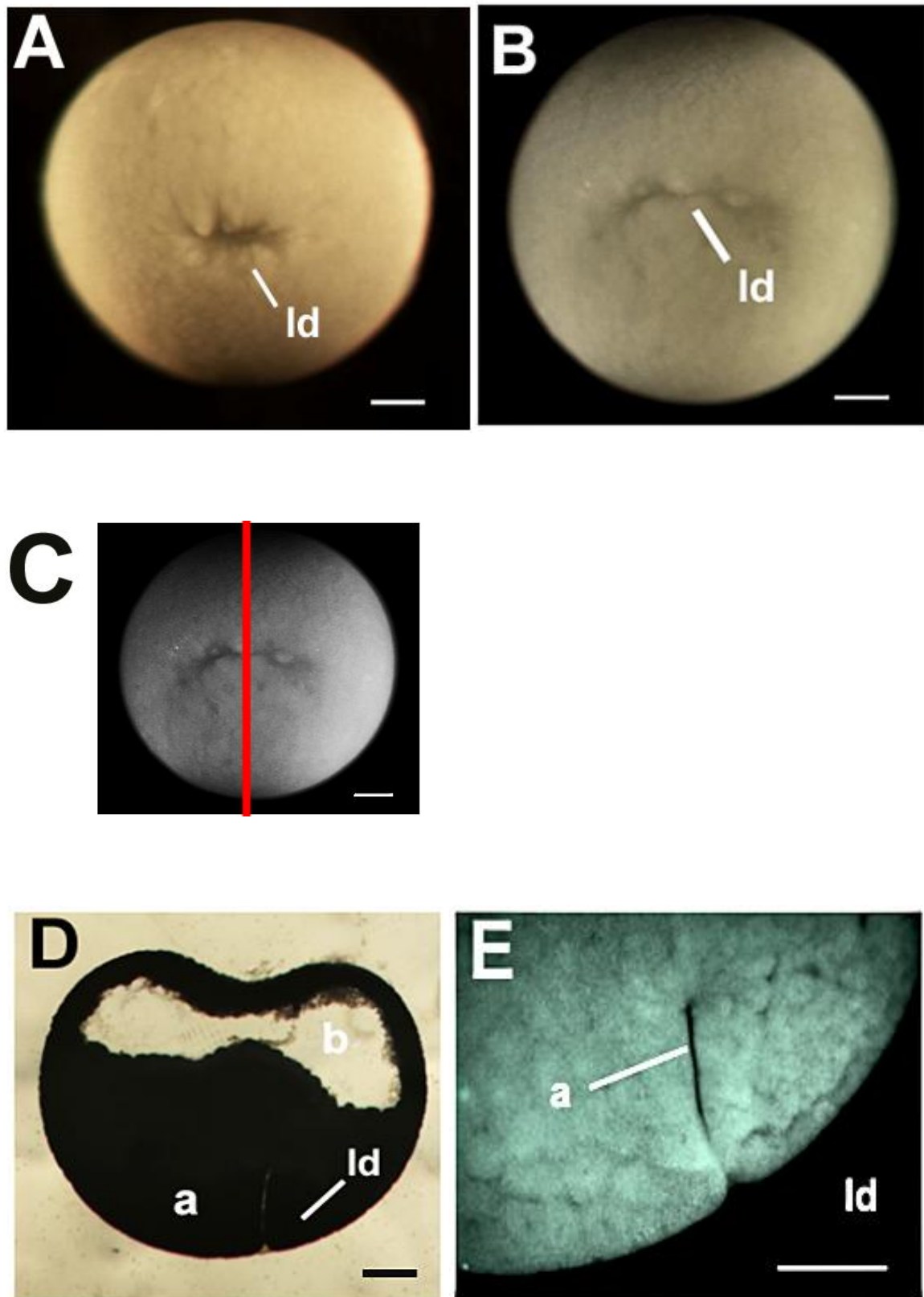


Figura 5. Morfología de la gástrula temprana de *Atelopus sp.* y *Atelopus elegans* (estadio 10): A y B son vistas desde el hemisferio vegetal, con el lado dorsal orientado hacia arriba. (A) Vista externa de la gástrula temprana de *Atelopus sp.* (B) Vista externa de una gástrula temprana de *Atelopus elegans*. Vista externa. (C) La misma imagen que se muestra en A, que muestra la orientación de las secciones que se muestran en D y E. (D) Sección sagital de la gástrula temprana de *Atelopus sp.* (E) Fluorescencia nuclear de la sección en C. Acercamiento del labio dorsal del blastoporo. Las barras en A, B, C y D corresponden a 200 μm , y en E corresponde a 50 μm .

Fig. 6

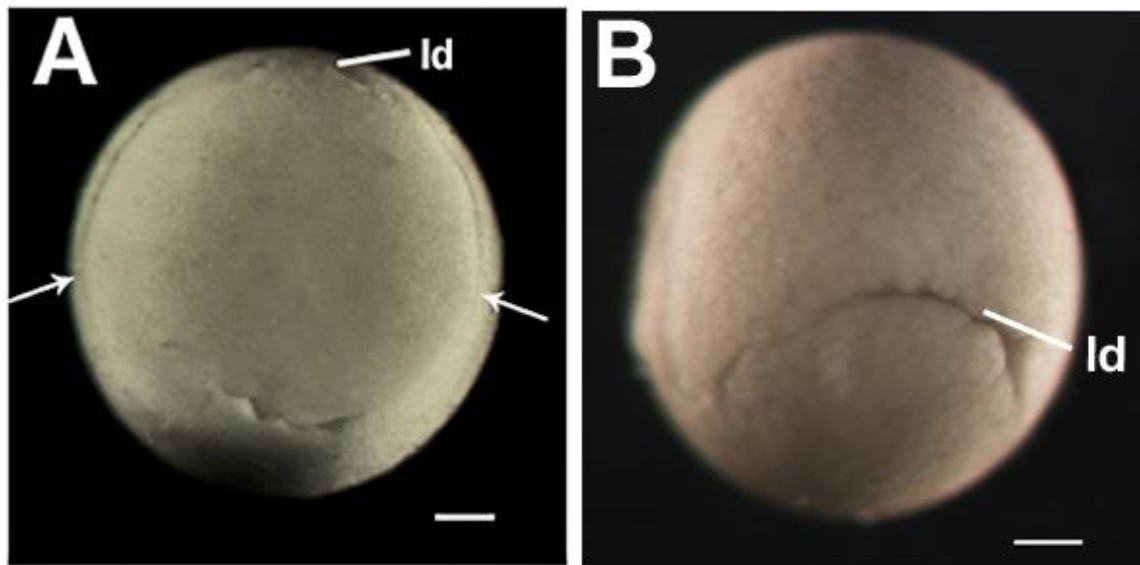


Figura 6. Morfología de la gástrula temprana de *Atelopus sp.* y *Atelopus elegans* (estadio 11): A es una vista desde el hemisferio vegetal, con el lado dorsal orientado hacia arriba. B es una vista desde el lado dorsal, con el hemisferio animal orientado hacia arriba (A) Gástrula de *Atelopus sp.* Las flechas señalan los labios laterales del blastoporo (B) Gástrula de *Atelopus elegans*. Las barras corresponden a 200 μm .

Fig.7.

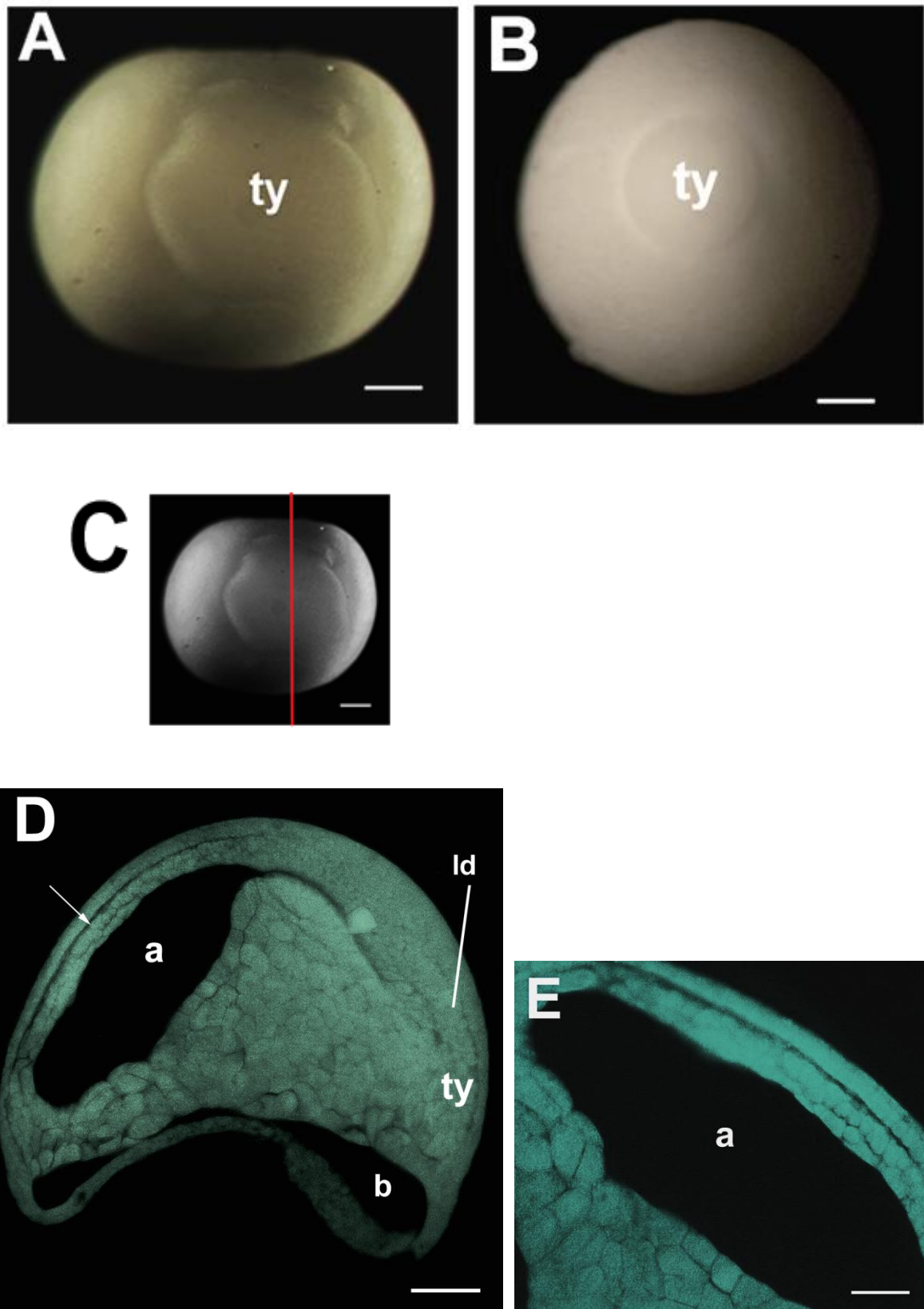


Figura 7. Morfología de la gástrula tardía de *Atelopus sp.*(estadio 12.5): A y B son vistas desde el hemisferio vegetal. (A) Gástrula tardía de *Atelopus sp.* (B) Gástrula tardía de *Atelopus elegans*. (C) La misma imagen que se muestra en A, que muestra la orientación de la sección sagital en D. (D) Sección sagital de la gástrula tardía de *Atelopus sp.* con tinción de fluorescencia. (E) Acercamiento al techo del arquenterón. Las barras en A, B y C corresponden a 200 μm , en D corresponden a 100 μm , y en E corresponden a 50 μm .

Fig. 8.

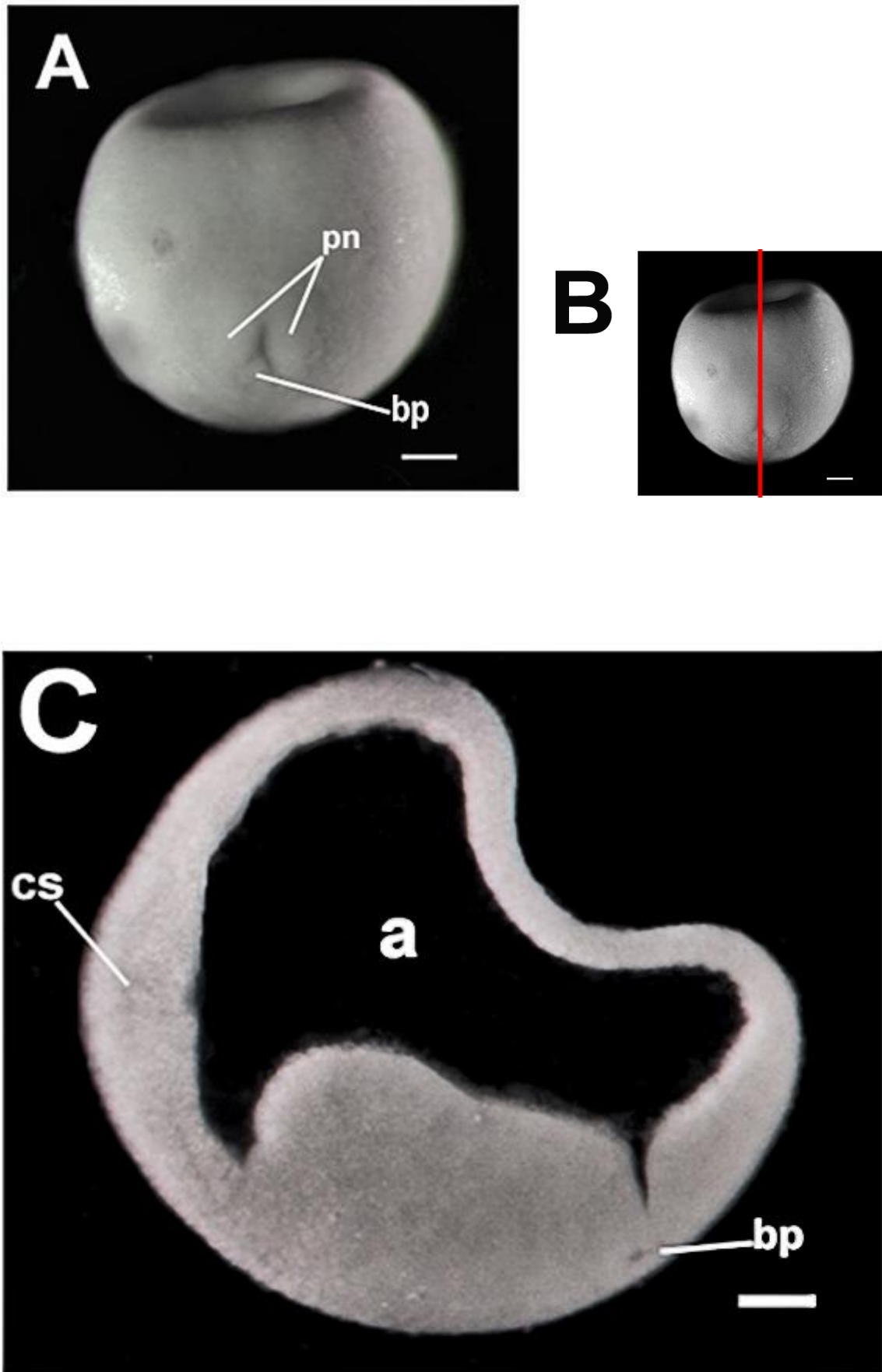


Figura 8. Morfología de la posgástrula de *Atelopus sp.* (estadio 13): A es una vista dorsal. (A) Posgástrula de *Atelopus sp.* (B) La misma imagen que se muestra en A, que muestra la orientación de la sección sagital en C. (C) Sección sagital de la posgástrula de *Atelopus sp.* Las barras en todas las imágenes corresponden a 200 μm .

Fig. 9.

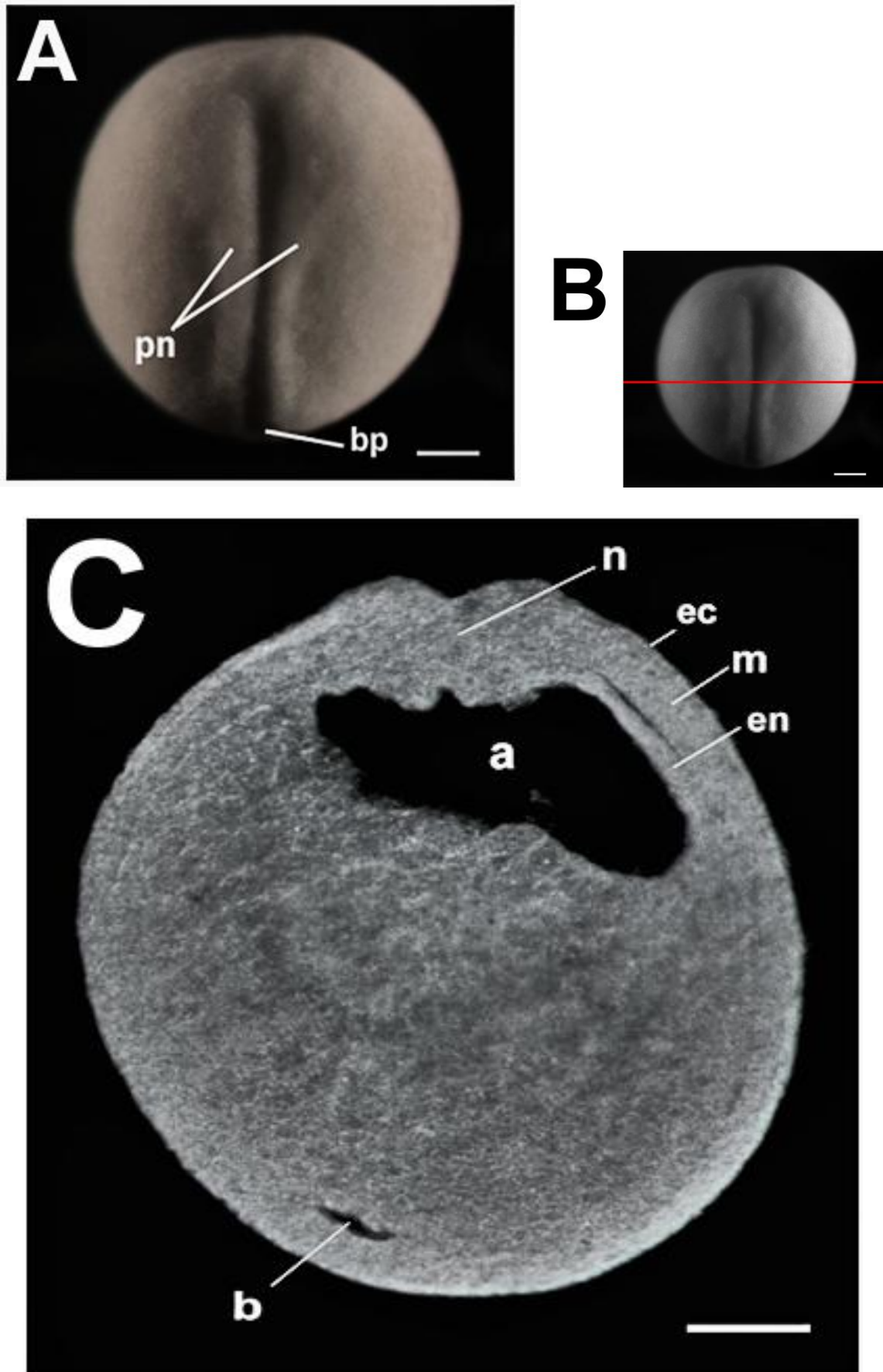


Figura 9. Morfología de la posgástrula de la néurula de *Atelopus elegans*. (estadio 15): A es una vista dorsal. (A) Néurula temprana de *Atelopus elegans*. (B) La misma imagen que se muestra en A, que muestra la orientación de la sección transversal en C. (C) Sección transversal de la posgástrula de *Atelopus sp.* Las barras en todas las imágenes corresponden a 200 μm .

Fig. 10.

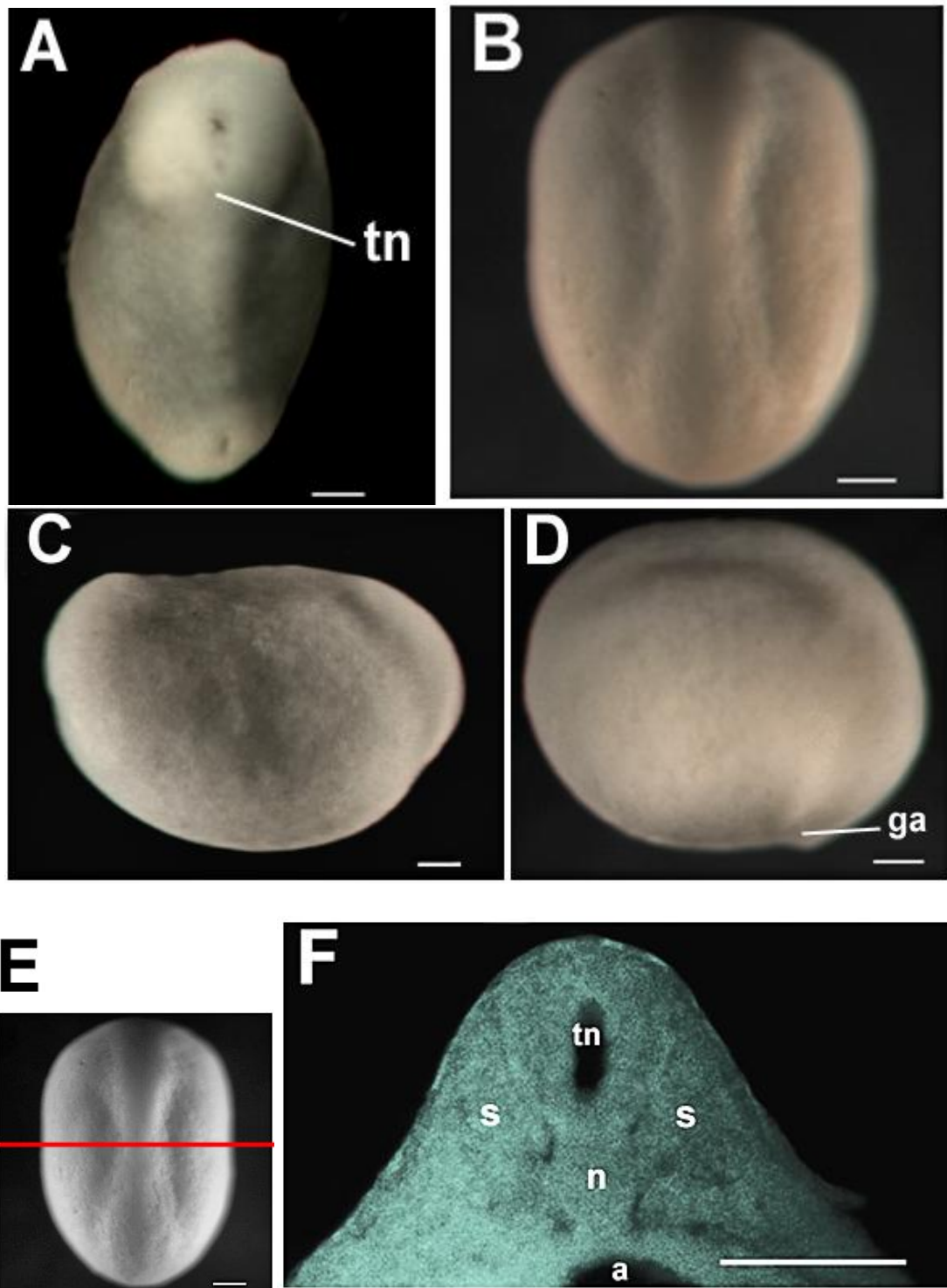


Figura 10. Morfología de la néurula tardía de *Atelopus sp.* y *Atelopus elegans* (estadios 16 y 16+): La región rostral en A y B está orientada hacia arriba. En C y D la región rostral está orientada hacia la derecha (A) Vista dorsal de la néurula tardía de *Atelopus sp.* (B) Vista dorsal de la néurula tardía de *Atelopus elegans*. (C) Vista lateral de la néurula tardía de *Atelopus sp.* (D) Vista lateral de la néurula tardía de *Atelopus elegans*. (E) La misma imagen que se muestra en B, que muestra la orientación de la sección transversal en F. (F) Sección transversal a través del tubo neural y el notocordio de *Atelopus elegans*. La barra en A, B, C, D y E corresponde a 200 μm , y en F corresponde a 100 μm .

Fig. 11.

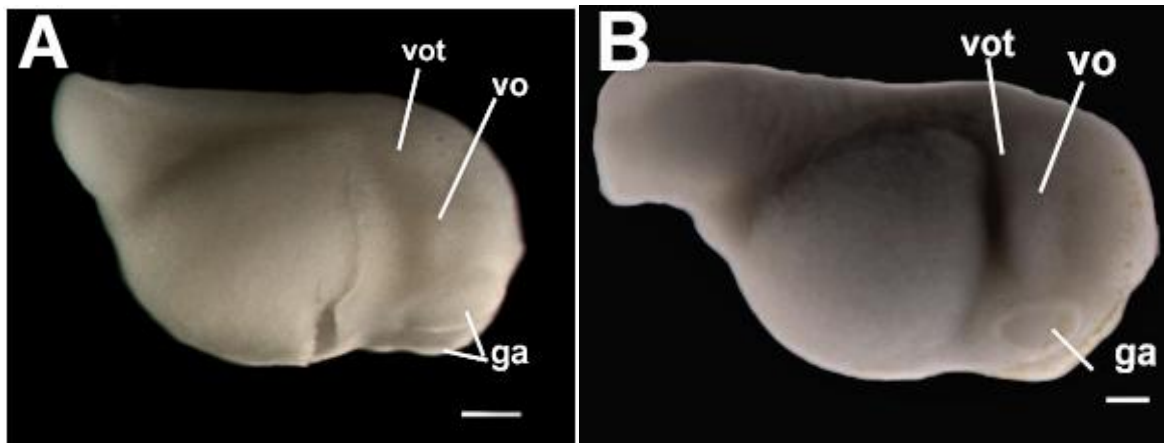


Fig. 11 Vista externa del estadio de respuesta muscular de *Atelopus sp.* y *Atelopus elegans* (Estadio 18): La región rostral está orientada hacia la derecha. (A) Estadio de respuesta muscular de *Atelopus sp.* (B) Estadio de respuesta muscular de *Atelopus elegans*. En ambas imágenes las barras corresponden a 200 μm .

Fig. 12

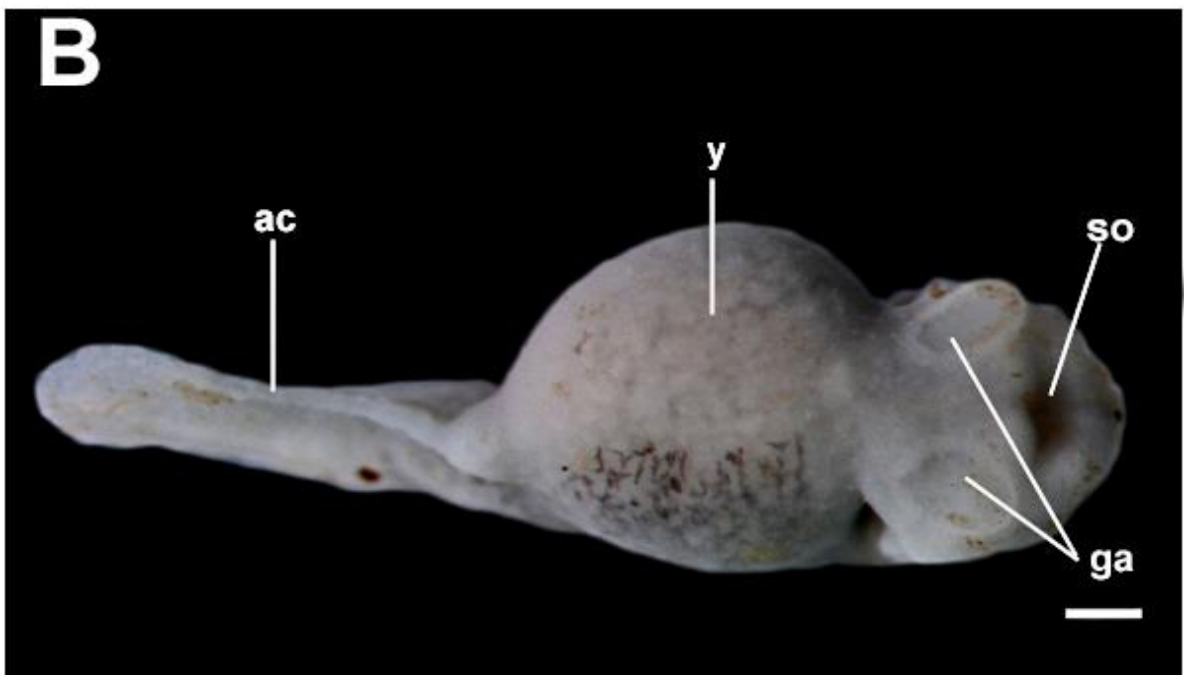


Fig. 12 Morfología de embriones a la eclosión de *Atelopus elegans* (estadio 21): A es una vista lateral, B es una vista ventral. En ambas imágenes la región rostral está orientada hacia la derecha. Las barras corresponden a 200 μm .

9. TABLAS

Tabla 1. Estadios del desarrollo de *Atelopus* en relación a la tabla del desarrollo de *Xenopus laevis* (Niewkoop y Faber, 1994) y la tabla general de Gosner (1960).

Estadios <i>Atelopus</i>	Estadios <i>X. laevis</i>	Estadios Gosner	Características de los embriones de <i>Atelopus</i>
7	7	7+	Blástula de células grandes.
8	8	8	Blástula de células medianas.
9	9	9	Blástula de células pequeñas.
10	10	10	Formación del labio dorsal.
11	11	10	Gástrula temprana: tapón de yema grande.
12,5	12,5	12	Tapón de yema pequeño
13	13	13	Post-gástrula: ranura del blastoporo
14	14	14	Estadio de placa neural
16	20	16	Nérula tardía: tubo neural cerrado
17	24	17	Yema de la cola, glándula adhesiva
18	26	18	Respuesta muscular.
21	33 40	21	Epidermis pigmentada, elongación de la cola, Eclosión

Tabla 2. Tiempo, en horas, minutos y días, entre los estadios (en concordancia con Gosner, 1960) del desarrollo obtenidos en las fijaciones de *Atelopus sp.* y *Atelopus elegans*

St.	<i>Atelopus sp.</i>		<i>Atelopus elegans</i>	
	Edad		Edad	
	Horas y minutos	Días	Horas y minutos	Días
7+	0:00		-	
8	5:20		0:00	
9	9:00		3:40	
10	24:50	1,03	7:30	
11	49:10	2,05	31:00	1,29
12,5	72:50	3,03	47:00	1,96
13	74:50	3,12		
15			66:00	2,75
16	-	-		
17			72:00	3
18	98:20	4,1	99:00	4,13
21			193:00	8,04

10. ANEXOS

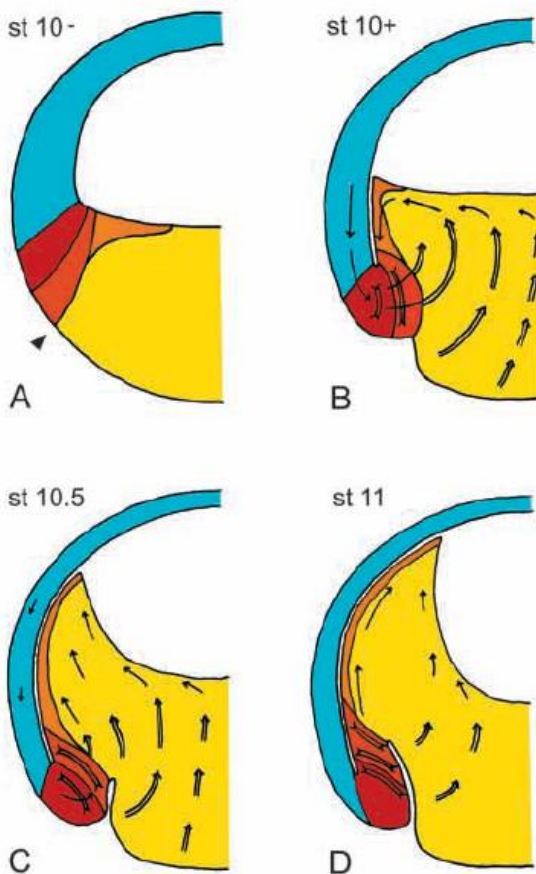




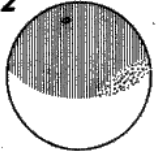



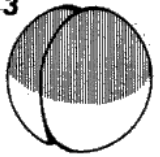


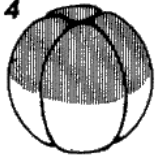






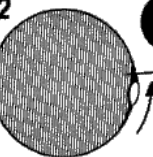



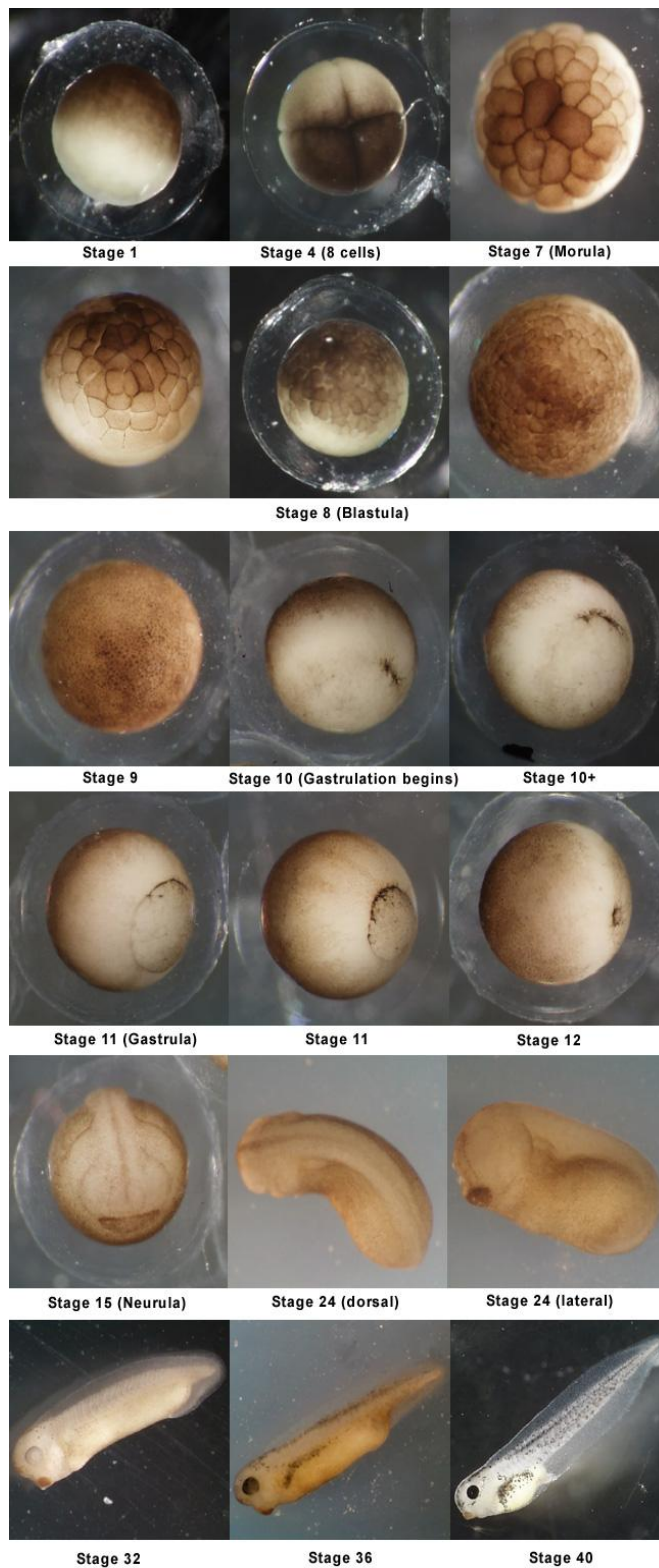
Fig. 9. Reconstruction of involution movements. Schematic drawings of stage 10- (A), stage 10+ (B), stage 10.5 (C) and stage 11 (D) dorsal gastrula halves. Yellow, prospective vegetal endoderm; orange, *cer*-expressing region; dark orange, *gsc* domain; red, *Xbra* domain; blue, prospective ectoderm of the BCR. Double arrows, active vegetal rotation movement; inverted double arrows, active radial intercalation; arrows, passive movement. Arrowhead, site of blastopore formation. For simplicity, suprablastoporal endoderm is omitted.

Anexo 1. Dibujos esquemáticos del movimiento morfogénico de rotación vegetal en *X. laevis* para diferentes estadios de la gástrula (Winklbauer y Shürfeld, 1998).

TABLE 1

1  FERTILIZATION	7  32- CELL	13  NEURAL PLATE	15  ROTATION
2  GRAY CRESCENT	8  MID-CLEAVAGE	14  NEURAL FOLDS	16  NEURAL TUBE
3  2- CELL	9  LATE CLEAVAGE	17  TAIL BUD	
4  4- CELL	10  DORSAL LIP	18  MUSCULAR RESPONSE	
5  8- CELL	11  MID-GASTRULA	19  HEART BEAT	
6  16- CELL	12  LATE GASTRULA	20  GILL CIRCULATION	

Anexo 2. Tabla generalizada para el desarrollo temprano de anuros de Gosner (1960).



Anexo 3. Estadios del desarrollo de *X. laevis* según el criterio morfológico de la tabla normalizada de Nieuwkoop y Faber (1994) (Cebra-Thomas, 2003).

Especie	Diámetro huevo (mm)	Tiempo de gastrulación (hrs)	T° (°C)	Citado en:
<i>Physalaemus albonotatus</i>	0,85 a 1	-	-	Zaracho <i>et al.</i> 2003
<i>Physalaemus biligonigerus</i>	0,97 - 1,15	-	-	Zaracho <i>et al.</i> 2003
<i>Physalaemus cuvieri</i>	0,9	-	-	Zaracho <i>et al.</i> 2003
<i>Physalaemus fernandezae</i>	0,9	-	-	Zaracho <i>et al.</i> 2003
<i>Physalaemus henselii</i>	0,9	-	-	Zaracho <i>et al.</i> 2003
<i>Physalaemus riograndensis</i>	0,9	-	-	Zaracho <i>et al.</i> 2003
<i>Physalaemus santafecinus</i>	0,9	-	-	Zaracho <i>et al.</i> 2003
<i>Engystomops randi</i>	1,1	11	18 a 22	Romero-Carvajal <i>et al.</i> , 2009
<i>Xenopus laevis</i>	1,2	5,75	23	Niewkoop y Faber, 1994
<i>Engystomops coloradorum</i>	1,35	14	18 a 22	Romero-Carvajal <i>et al.</i> , 2009
<i>Atelopus sp.</i>	1,4	50	18 a 23	Este estudio
<i>Physalaemus cf. fuscomaculatus</i>	1,4	-	-	Giaretta y Menin, 2004
<i>Colostethus machalilla</i>	1,6	72	18 a 22	del Pino <i>et al.</i> 2004
<i>Epipedobates anthonyi</i>	2	72	18 a 22	del Pino <i>et al.</i> , 2007
<i>Epipedobates tricolor</i>	2	72	18 a 22	del Pino <i>et al.</i> , 2007
<i>Bombina orientalis</i>	2,5	12-17	20 a 22,5	Michael, 1981
<i>Gastrotheca riobambae</i>	3	168	18 a 22	del Pino y Escobar, 1981
<i>Eleutherodactylus coqui</i>	3,5	24	-	Townsend y Stewart, 1985

Anexo 4. Diámetros de huevo y tiempos de gastrulación en varias especies de anuros.

El tiempo de gastrulación es el tiempo que transcurre entre la formación del labio dorsal y el cierre del blastoporo.

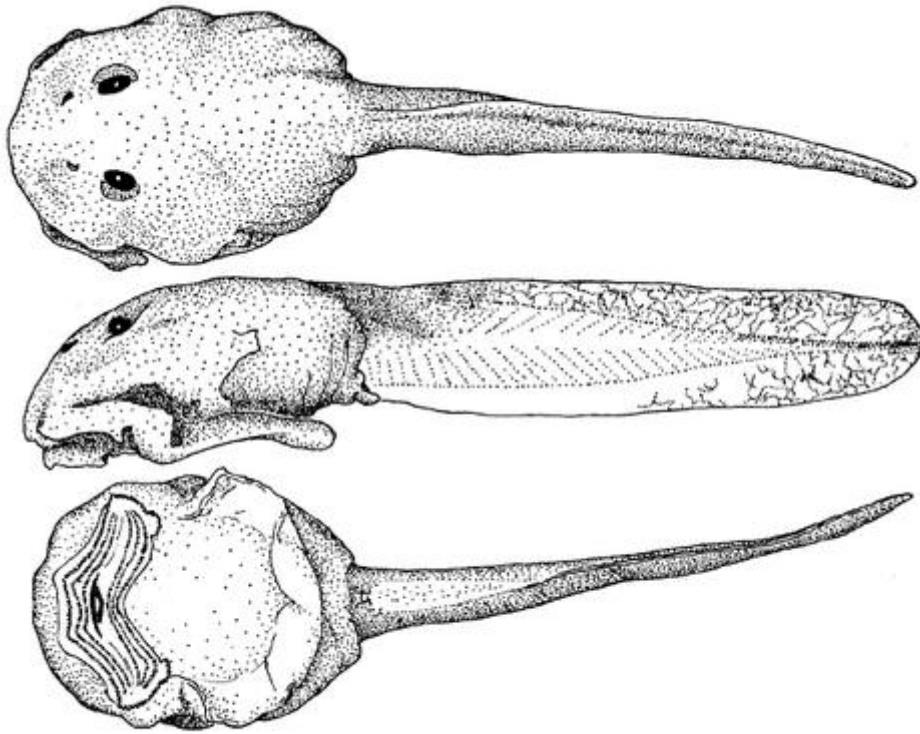


FIG. 3.—Tadpole of *Atelopus ignescens ignescens*, KU 124162, $\times 7.5$.

Anexo 5. Renacuajo de *Atelopus ignescens ignescens*. (Duellman y Lynch, 1969).