PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estudio del patrón de consumo de plaquetas de yema del endodermo en *Espadarana prosoblepon* (Centrolenidae) e *Hyloxalus elachyhistus* (Dendrobatidae)

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

Henry Fabián Macías Bazante

Quito, 2019

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. Henry Fabián Macías Bazante ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Andrés Romero Carvajal

Director de la Disertación
Quito, 20 de marzo del 2019

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por el apoyo que me han brindado toda la vida, por ser mi ejemplo a seguir y por su cariño incondicional. A mis hermanos por las aventuras y su compañía en todo momento.

A mi abuelita por siempre haberme dado todo su cariño y lo mejor de sí. A Violetita y Miguelito que han sido como mis segundos padres.

Agradezco al Doctor Andrés Romero-Carvajal por haberme permitido formar parte de su laboratorio, por su guía durante el desarrollo de este trabajo; además por su confianza y por incentivarnos a aprender cosas nuevas cada día. A María José Salazar por sus enseñanzas en el laboratorio.

A mis amigos de toda la vida Christian y Ángel por todas las experiencias y anécdotas compartidas. A Santy, Ricardo, Andrés, Christopher, Diego, Francisco y Vale por su amistad y por todos los momentos agradables que hemos compartido.

Agradezco a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento para la realización de este proyecto. A la Balsa de los Sapos por la colaboración con los especímenes.

A Julissa por su compañía y apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN 1
2. ABSTRACT 2
3. INTRODUCCIÓN 3
3.1 EL ENDODERMO Y LA FORMACIÓN DEL INTESTINO 5
3.2 *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus* 6
3.3 OBJETIVOS 8
3.3.1 OBJETIVO GENERAL 8
3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 8
4. MATERIALES Y MÉTODOS 9
4.1 DISECCIÓN DEL INTESTINO 9
4.2 CORTES HISTOLÓGICOS 9
4.3 FIJACIÓN DE EMBRIONES 10
4.4 TINCIÓN SAFRANINA Y FAST GREEN 13
4.5 ANÁLISIS DE IMÁGENES Y CUANTIFICACIÓN DE COLOR 14
5. RESULTADOS 16
5.1 DISECCIÓN DEL INTESTINO 16
5.2 CORTES HISTOLÓGICOS Y CONSUMO DE PLAQUETAS DE YEMA 17
5.2.1 DIFERENCIACIÓN MORFOLOGÍA DEL ENDODERMO 17
5.2.2 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE PLAQUETAS DE YEMA 18
5.2.3 CONSUMO DE PLAQUETAS DE YEMA DEL ENDODERMO 18
6. DISCUSIÓN 20
6.1 MORFOLOGÍA DEL INTESTINO 20
6.2 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE PLAQUETAS DE YEMA INACTIVAS 22
6.3 CONSUMO DE PLAQUETAS DE YEMA DEL ENDODERMO 24

6.4 TASA DE CONSUMO DE PLAQUETAS DE YEMA Y LA DIFERENCIACIÓN MORFOLOGÍCA. IMPLICACIONES ECOLÓGICAS 27

7. CONCLUSIONES 30

8. RECOMENDACIONES 31

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 32

10. FIGURAS 35

11. TABLAS 43

12. ANEXOS 44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Intestino de *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus* en estadio 25. ..36
Figura 2. Secuencia de secciones transversales con tinción safranina y fast green durante la embriogénesis tardía de *Espadarana prosoblepon* 38
Figura 3. Secuencia de secciones transversales con tinción safranina y fast green durante la embriogénesis tardía de *Hyloxalus elachyhistus* 40
Figura 4. Comparación del porcentaje de plaquetas de yema inactivas presentes en estadios de embriogénesis tardía en *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus* 41
Figura 5. Comparación del porcentaje de plaquetas de yema con tinción de color rojo en estadios de embriogénesis tardía en *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus* ...42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Promedio de plaquetas de yema inactivas en estadios de embriogénesis tardía en *Espadarana prosoblepon.* 43
Tabla 2. Promedio de plaquetas de yema inactivas en estadios de embriogénesis tardía en *Hyloxalus elachyhistus.*.....43

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Individuos de *Espadarana prosoblepon* utilizados para las disecciones.....44
Anexo 2. Individuos de *Hyloxalus elachyhistus* utilizados para las disecciones 44
Anexo 3. Lista de embriones de *Espadarana prosoblepon* utilizados para realizar la tinción safranina y fast green 45
Anexo 4. Lista de embriones de *Hyloxalus elachyhistus* utilizados para realizar la tinción safranina y fast green 46
Anexo 5. Tabla de ANOVA de una vía con la comparación de plaquetas de yema inactivas entre individuos del mismo estadio de las especies *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus*. 47
Anexo 6. Lista de las soluciones utilizadas y su fórmula molar.....48

1. RESUMEN

El desarrollo de los embriones de anuros, por lo general, es un proceso externo; la mayoría de especies depositan sus huevos en el ambiente. Por esta razón, en el huevo existen reservas nutricionales, que son almacenadas en las plaquetas de la yema (PY). El consumo de las PY está directamente relacionado con la diferenciación morfológica del embrión ya que las proteínas de la yema son el principal recurso de aminoácidos esenciales para su desarrollo. En la embriogénesis tardía, las PY que se encuentran en el endodermo se empiezan a consumir aportando los nutrientes necesarios para la formación del sistema digestivo y para el crecimiento del renacuajo. Se realizó este estudio para determinar si el patrón de consumo de PY del endodermo está relacionado con el tipo y tiempo de desarrollo de los embriones. Para esto se describió el patrón de consumo de PY del endodermo y la morfología del intestino de *Espadarana prosoblepon* (Centrolenidae), una especie con desarrollo rápido y de *Hyloxalus elachyhistus* (Dendrobatidae), que tiene desarrollo lento y cuidado parental. Se realizaron cortes histológicos y se los tiñó con safranina y fast green (FG), con el objetivo de cuantificar el porcentaje de PY inactivas. Además, se disectaron individuos recién eclosionados de ambas especies. El intestino de *Espadarana prosoblepon* se empieza a formar en el estadio 25 y en *Hyloxalus elachyhistus* se inicia en el estadio 24. Al momento de la eclosión el intestino de *Espadarana prosoblepon* está poco diferenciado y tiene una gran masa de yema altamente vascularizada; mientras que el intestino de *Hyloxalus elachyhistus* es elongado, enrollado y tiene pocos remanentes de yema. A pesar de las diferencias en la morfología del intestino, el consumo de las PY del endodermo es similar entre los diferentes estadios de desarrollo de ambas especies. Esto sugiere que las PY de *E. prosoblepon* no se utilizan exclusivamente para formar el intestino, lo cual sí sucede en *H. elachyhistus.* Estas diferencias se pueden deber a la presencia de cuidado parental, al tipo y tiempo de desarrollo y de eclosión.

Palabras clave: Endodermo, *Espadarana prosoblepon, Hyloxalus elachyhistus*, intestino, plaquetas de yema.

2. ABSTRACT

The development of anuran embryos is usually an external process; most species deposit their eggs in the environment. For this reason, there are nutritional reserves in the egg, which are stored in the yolk platelets (YPs). The consumption of YPs is directly related to the morphological differentiation of the embryo, since yolk proteins are the main resource of essential amino acids for embryonic development. In late embryogenesis, YPs that remain in the endoderm are consumed, providing the necessary nutrients for the formation of the digestive system and for the growth of the tadpole. We conducted this study to determine if the pattern of consumption of YPs in the endoderm is related to the timing or type of development. To this end, the consumption pattern of YPs of the endoderm and the morphology of the intestine of *Espadarana prosoblepon* (Centrolenidae), which is a fast-developing species, and of *Hyloxalus elachyhistus* (Dendrobatidae), which is a low-developing species, is described. Histological sections were made and stained with safranin and fast green (FG), in order to quantify the percentage of inactive YPs. In addition, newly hatched individuals of both species were dissected. The intestine of *Espadarana prosoblepon* begins to form in stage 25 and in *Hyloxalus elachyhistus* begins in stage 24. At the time of hatching the intestine of *Espadana prosoblepon* is poorly differentiated and has a large mass of highly vascularized yolk; while the intestine of *Hyloxalus elachyhistus* is elongated, coiled and has few yolk remnants. In spite of the differences in the morphology of the intestine, the consumption of the YPs of the endoderm is similar between the different stages of development of both species. This suggests that *E. prosoblepon* YPs are not used exclusively to form the intestine, which does happen in *H. elachyhistus.* These differences may be due to the presence of parental care, type and time of development and hatching.

Key words: Endoderm, *Espadarana prosoblepon*, *Hyloxalus elachyhistus*, gut, yolk platelets.

3. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los embriones de anuros por lo general es un proceso externo; la mayoría de especies depositan sus huevos en el ambiente. Por esta razón, en el huevo existen reservas nutricionales (principalmente fosfo-lipo-glicoproteínas) que son almacenadas en las plaquetas de la yema (PY) (Fagotto y Maxfield, 1994; Jorgensen, Steen, Steen y Kirschner, 2009).

Las plaquetas son organelas densas donde se almacena la yema (Jorgensen et al., 2009). Su estructura está formada por una capa granular periférica compuesta de proteínas y polisacáridos, y un cristal central formado por fosfovitina y lipovitalina (Fagotto y Maxfield, 1994; Jorgensen et al., 2009; Komazaki, Tanaka y Nakamura 2002; Selman y Pawsey, 1965; Wallace, 1963). Estas se forman en los últimos estadios de la oogénesis y están compuestas de derivados de vitelogenina, que es sintetizada en el hígado de la madre. La vitelogenina es transportada hasta los ovarios por el torrente sanguíneo y se acumula en las plaquetas de yema del oocito en crecimiento, por endocitosis (Grant y Hirsh, 1999; Wallace y Bergink, 1974).

En los amniotas, las plaquetas de yema se almacenan en el saco de yema y los nutrientes se distribuyen hasta los tejidos por el sistema circulatorio (Elinson, Stewart, Bonneau y Blackburn, 2014; Jorgensen, 2008). Por otra parte, en los anfibios todas las células de los embriones tienen plaquetas de yema distribuidas en el citoplasma, que son consumidas intracelularmente (Jorgensen et al., 2009; Selman y Pawsey, 1965).

La diferenciación morfológica está directamente relacionada con el consumo de las plaquetas de yema (Jorgensen et al., 2009; Selman y Pawsey, 1965). En *Xenopus laevis* a partir del tercer día de desarrollo se ha observado que existe diferenciación celular para la formación de tejidos y se inicia el consumo de PY (Chalmers y Slack, 1998; Selman y Pawsey, 1965). Las proteínas de la yema son el principal recurso de aminoácidos esenciales para el embrión (Jorgensen et al., 2009). Los aminoácidos esenciales sirven para la síntesis de proteínas, durante la formación de tejidos. La energía para el desarrollo no se obtiene de los aminoácidos de las PY, si no que proviene de la oxidación de los carbohidratos y lípidos, de estás (Jorgensen et al., 2009; Selman y Pawsey, 1965).

Los mecanismos de activación que desencadenan el consumo de PY son poco conocidos (Fagotto y Maxfield, 1994). En *X. laevis* se ha observado que la acidificación de las PY activa la acción de proteasas. Así, la degradación de PY se inicia cuando estas se unen a endosomas o lisosomas, en los cuales bombas de protones endocíticas provocan la acidez en las PY. Después de todos estos procesos, las enzimas hidrolasas están disponibles para romper los enlaces químicos presentes en las plaquetas de yema (Jorgensen et al., 2009; Komazaki et al., 2002).

Las plaquetas de yema son degradadas durante la embriogénesis tardía, en diferentes estadios, y se da de forma autónoma en cada célula (Fagotto y Maxfield, 1994; Jorgensen et al., 2009). Cuando se inicia la degradación de las plaquetas de yema, el primer cambio físico que se observa es la eliminación de la capa granular periférica. Inmediatamente después, se observan los primeros signos de diferenciación celular. Las demás modificaciones en las PY se producen por degradación, erosión y fragmentación del cristal. Terminando con la digestión de toda la plaqueta (Fagotto y Maxfield, 1994).

Las PY son altamente conservadas en varios linajes *(Galaxea fascicularis, Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis* y *Aedes aegypti*), tienen muchas proteínas homólogas y se forman por el mismo mecanismo (Grant y Hirsh, 1999; Hayakawa, Andoh y Watanabe, 2006; Jorgensen et al., 2009; Roth y Porter, 1964). En *Xenopus laevis* los gradientes de plaquetas de yema se forman en la oogénesis y durante el reordenamiento del citoplasma, a lo largo del eje animal-vegetal. Las plaquetas más pequeñas por lo general se encuentran en el polo animal y las más grandes en el polo vegetal (Jorgensen et al., 2009; Komazaki et al., 2002).

Las PY se activan individualmente y no se consumen todas simultáneamente porque es necesaria la distribución de nutrientes en todas las etapas de diferenciación celular. Al parecer, en *Xenopus laevis* existen sensores intracelulares que detectan la cantidad de nutrientes y envían señales que activan las plaquetas de yema y regulan la velocidad a la que liberan nutrientes (Jorgensen et al., 2009).

Durante las últimas etapas de la embriogénesis los nutrientes de las plaquetas de yema son liberados en las células del intestino, migran por la sangre y son absorbidos por

los tejidos en crecimiento (Jorgensen et al., 2009). En el estadio 46, el intestino es el único tejido donde hay yema y esta sirve para alimentar al renacuajo (Chalmers y Slack, 1998; Selman y Pawsey, 1965).

3.1 EL ENDODERMO Y LA FORMACIÓN DEL INTESTINO

El endodermo es la capa embrionaria cuyas células están destinadas a formar el revestimiento de los órganos del sistema respiratorio y del sistema digestivo. Además, actúa como inductor para la formación del notocordio, corazón y los vasos sanguíneos (Chalmers y Slack, 2000; Gilbert, 2005).

En anfibios el endodermo se forma en la parte vegetal de los embriones y está formado por una gran cantidad de células, las cuales se diferencian y aportan con nutrientes derivados de PY, los cuales son esenciales para formar el intestino y para el crecimiento de los embriones (Jorgensen et al., 2009; Selman y Pawsey, 1965).

En *Xenopus laevis*, el sistema digestivo se forma a partir del tubo gástrico primitivo, que está compuesto de dos capas de células derivadas del endodermo y el mesodermo. La capa interna de origen endodermal se diferencia en el revestimiento epitelial del tracto gastro intestinal y la capa externa, derivada del mesodermo, forma el músculo visceral y el tejido conjuntivo (Womble, Pickett y Nascone-Yoder, 2016). La región anterior del tubo intestinal primitivo se diferencia en esófago, páncreas, hígado y estómago; y las partes media y posterior, se diferencian en el intestino (Chalmers y Slack, 2000; Womble et al., 2016). Las regiones media-posterior del intestino primitivo sufren varios cambios morfológicos; entre estos, la formación del lumen, alargamiento y rotación a la izquierda, a la vez que el mesodermo visceral y el revestimiento epitelial, se diferencian (Womble et al., 2016).

Para formar el intestino alargado las células de las regiones media y posterior del endodermo se reorganizan en el eje antero posterior, intercalándose entre ellas hasta formar una sola capa de células, las cuales forman el epitelio intestinal (Chalmers y Slack, 2000; Womble et al., 2016).

En anfibios se pueden clasificar dos tipos de células endodermales según su función, las que se diferencian para formar tejidos y las que únicamente son consumidas y utilizadas como alimento, denominadas endodermo nutricional. En *Eleutherodactylus coqui* existen los dos tipos de células endodermales, de las cuales la mayoría son nutricionales y se consumen en su totalidad, durante y después del desarrollo (Buchholz et al., 2007; Chalmers y Slack, 2000; Elinson, 2009; Karadge y Elinson, 2013; Womble et al., 2016).

3.2 *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus*

Espadarana prosoblepon está cercanamente relacionada con *Espadarana callistomma* y *Espadarana andina* (Guayasamin, Varela-Jaramillo y Frenkel, 2018). Estas ranas depositan los huevos en rocas cubiertas por musgos, en ramas y en la superficie inferior o superior de hojas de plantas que se encuentran en bordes de cuerpos de agua (Guayasamin et al., 2018; Salazar-Nicholls y del Pino, 2015). Después de la eclosión los renacuajos caen a los cuerpos de agua cercanos; estos viven en el sustrato a lo largo de la costa y son fosoriales (Delia, Cisneros-Heredia, Whitney y Murrieta-Galindo, 2010).

Las ranas de cristal tienen un desarrollo rápido y la gastrulación se superpone a la elongación del notocordio. En *Espadarana callistomma* los huevos son grandes (2.1 mm de diámetro) en comparación con huevos de otras especies de desarrollo rápido (Salazar-Nicholls y del Pino, 2015; Vargas y del Pino, 2017).

El género *Hyloxalus* tiene un desarrollo lento y la elongación del notocordio se da después del cierre del blastoporo (Hervas y del Pino, 2013). En *Hyloxalus vertebralis* las posturas son colocadas en el suelo y consisten de aproximadamente 5-12 huevos, con un diámetro promedio de 2.6 mm. Después de que los renacuajos eclosionan, los machos se encargan de transportarlos a arroyos (Coloma, 1995).

Existe poca información sobre la tasa y eficiencia de consumo de la yema en embriones de anuros. Únicamente existen dos estudios previos que describen el patrón de consumo de PY en *Xenopus laevis* (Jorgensen et al., 2009; Selman y Pawsey, 1965). En el mundo existen 7021 especies de anuros descritas, de las cuales se sabe muy poco sobre cuál es el destino celular de las células del endodermo (Frost, 2019). El análisis del consumo de

PY y la formación del intestino en *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus* permitirá tener más información acerca del metabolismo en embriones de especies con desarrollo rápido y lento.

En este estudio se realizó una comparación del consumo de las PY de una especie de desarrollo rápido, *Espadarana prosoblepon* y una de desarrollo lento, *Hyloxalus elachyhistus*. Se esperaba que la especie de desarrollo lento tengan una taza de consumo de PY más baja, en los diferentes estadios, con respecto a la especie de desarrollo rápido. Sin embargo, en ambas especies las tazas de consumo de PY no tienen diferencias altamente significativas, en ninguno de los estadios. A pesar de que el consumo de PY es similar en ambas especies, el intestino de *Espadarana prosoblepon* está poco desarrollado en comparación al de *Hyloxalus elachyhistus* que se encuentra elongado y enrollado, al momento de la eclosión.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el patrón de consumo de plaquetas de yema del endodermo de *Espadarana prosoblepon* (Centrolenidae) e *Hyloxalus elachyhistus* (Dendrobatidae).

3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un protocolo para determinar el consumo de plaquetas de yema en embriones tardíos y en el intestino de anuros.
- Cuantificar y comparar la tasa de consumo de plaquetas de yema del endodermo de *Espadarana prosoblepon* y de *Hyloxalus elachyhistus.*
- Describir la morfología del intestino al momento de la eclosión.
- Identificar los estadios en que se inicia y termina el consumo de yema del intestino.
- Identificar el sitio del intestino de renacuajos donde se alojan los remanentes de la yema embrionaria.
- Determinar si existen factores especie-específicos involucrados en la cantidad de plaquetas de yema y su consumo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los embriones utilizados en este estudio fueron donados por la Iniciativa de Conservación "Balsa de los Sapos" de la PUCE. Las posturas se mantuvieron en cámaras húmedas, elaboradas en cajas Petri, con plástico cortado en cuadrados y papel toalla humedecido con agua destilada.

4.1 DISECCIÓN DEL INTESTINO

Se realizaron disecciones a renacuajos recién eclosionados (máximo 2 días post eclosión) de *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus*. Los renacuajos se obtuvieron de varias posturas. Se utilizaron 12 individuos para *Espadarana prosoblepon* y 10 individuos para *Hyloxalus elachyhistus* (Anexo 1 y 2).

Para *Espadarana prosoblepon* se utilizaron individuos fijados en formaldehido 4% en PBS 1x, debido a la falta de disponibilidad de posturas al momento de realizar las disecciones. Se colocaron los individuos en Steinberg 1x y se realizó la disección.

Para *Hyloxalus elachyhistus* se colocó cada individuo en Steinberg 1x y se adicionó 200 µl del anestésico MS-222 (4gr/l, SIGMA), hasta que el individuo quedó totalmente sedado y se procedió a realizar la disección (Chalmers y Slack, 1998).

A cada individuo se le realizó una incisión a nivel del ano y se procedió a abrir la piel desde la parte posterior hacia la anterior. Se les extrajo el intestino y se tomaron fotografías que sirvieron para describir su morfología e identificar los sitios donde se encontraban remanentes de yema. Se utilizó un estereomicroscopio Olympus SZX16, con la cámara Olympus DP73 y el programa Cellsense standard. Los intestinos fueron fijaron en formaldehido 4% en PBS 1x y se almacenaron a 4 °C.

4.2 CORTES HISTOLÓGICOS

Para realizar la cuantificación del consumo de plaquetas del endodermo de *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus* se utilizó la metodología descrita por

Selman y Pawsey (1965), basada en una tinción con safranina y fast green (FG) para identificar las plaquetas de yema activas e inactivas.

En las plaquetas de yema inactivas, la safranina tiene alta afinidad por el cuerpo cristalino y el fast green por la capa granular periférica (Selman y Pawsey, 1965). La safranina se une a los grupos fosfato presentes en el cuerpo cristalino y el FG se adhiere a proteínas como, albúmina, globulina, colágeno y fibrinógeno (Selman y Pawsey, 1965; Wallace, 1963).

Las plaquetas de yema antes de ser consumidas están formadas por la capa granular periférica, que se tiñe con FG (color azul) y el cuerpo cristalino, teñido con safranina (color rojo). Cuando se inicia la diferenciación la capa granular periférica pierde el color azul y las plaquetas se ven totalmente rojas. En las siguientes etapas de diferenciación la afinidad de las plaquetas por el fast green se incrementa porque el cuerpo cristalino se empieza a degradar. Cuando esto sucede se pueden ver cambios de tinción. En las plaquetas de yema se incrementan las zonas teñidas con FG, se puede observar el aumento de coloración azul desde la periferia de las plaquetas hacia el centro, así como también se pueden ver franjas teñidas de azul a través de las PY. En las primeras etapas de consumo la tinción con safranina todavía es predominante, debido a que el cuerpo cristalino no está muy degradado. A medida que avanza el consumo las PY pierden el color rojo. Las plaquetas de yema que se encuentran consumidas casi, o en su totalidad, se tiñen completamente de azul. Por lo tanto, todas las plaquetas que presentan tinción azul son plaquetas activas, a excepción de las que presentan la capa granular periférica (Selman y Pawsey, 1965). En este caso, se cuantifica las plaquetas inactivas que son de color rojo y carecen de tinción azul.

4.3 FIJACIÓN DE EMBRIONES

Para realizar las tinciones en los cortes histológicos se utilizaron individuos de *Espadarana prosoblepon* y de *Hyloxalus elachyhistus* de diferentes estadios, entre el estadio 17 (organogénesis temprana) hasta la eclosión, de acuerdo a las tablas de desarrollo de Salazar-Nicholls y del Pino (2015) para *Espadarana prosoblepon* y Hervas, Torres, Montenegro-Larrea y del Pino (2015) para *Hyloxalus elachyhistus*. Se retiró toda la gelatina y la membrana vitelina; esto se realizó en la solución Steinberg 1x. Se fijaron los embriones

en Smiths, después de 24 horas se los traspasó a formaldehido 4% en PBS 1x y se los almacenó a 4 °C.

Los embriones se obtuvieron de varias posturas provenientes de diferentes madres. Para los cortes histológicos se utilizaron tres individuos por estadio para cada especie (Anexo 3 y 4).

Día 1

Se removió la solución de formaldehido 4%- PBS 1x por la solución de PBS 1x + Sacarosa 5% y se dejaron los embriones en la solución por 1 hora.

Deshidratación de los tejidos fijados (Pantin, 1948; Pérez, 2019)

Se realizaron los siguientes lavados en etanol a diferentes concentraciones:

- 1 lavado de 10 minutos con etanol al 70%.
- 2 lavados de 10 minutos con etanol al 90%.
- 3 lavados de 10 minutos con etanol al 95%.

Después de realizar los lavados en etanol se dejaron los tejidos en Amil Acetato durante toda la noche.

Día 2

Aclaramiento de tejidos con Tolueno al 100%

- Se utilizaron los tejidos que se dejaron en Amil Acetato durante toda la noche (último paso día 1).
- Se utilizaron placas cóncavas escavadas de vidrio y pipetas Pasteur, porque el tolueno disuelve el plástico.
- Se realizaron 3 lavados de 20 minutos en tolueno al 100%.

Inclusión de Paraplast

- Los tejidos aclarados se colocaron en placas cóncavas escavadas llenas de paraplast (parafina purificada) a 60 °C.
- Se realizaron 3 lavados en paraplast: 2 lavados de 30 minutos y uno de 1 hora. Se utilizaron paletas de plástico previamente calentadas a 60 °C en la incubadora para traspasar los tejidos de un pocillo a otro.
- Se llenaron los moldes de plástico con paraplast y se introdujo rápidamente los tejidos infiltrados. Se colocaron los embriones en posición vertical con agujas de disección previamente calentadas. Se agregó una etiqueta con los datos de postura de cada individuo.
- Se dejó secar los moldes a temperatura ambiente. Previo a la realización de los cortes se colocó un bloque de madera en la parafina, para tener una base firme que se pueda sostener en el micrótomo.

Cortes con Micrótomo

- Se extrajo de los moldes de plástico el cubo de paraplast con el tejido, se eliminó el exceso de paraplast y se recortó el cubo en forma de trapezoide.
- Se colocaron los cubos de paraplast a 4 °C.
- Los portaobjetos se lavaron con agua destilada y etanol al 70%, y se los colocó en la plancha a 40 °C.
- Se encendió el baño maría y se fijó la temperatura entre 40 °C y 50 °C.
- Se colocó el bloque de madera en el micrótomo.
- Se colocó una cuchilla nueva.
- Se ajustó el micrótomo para realizar cortes de 5 µm.
- Se realizaron cortes transversales de la zona media del embrión. Se cortó manualmente el paraplast hasta llegar al tejido; a partir de ese momento se utilizó el corte automático continuo.
- Se utilizó una gillette para separar los cortes, con pinzas de relojero se extrajo la secuencia de cortes y se la colocó en el agua caliente hasta que se alisaron completamente.
- Las tiras de los cortes se sacaron del agua utilizando portaobjetos precalentados.
- Se colocaron las placas en la incubadora a 40 °C toda la noche, para que se evapore el exceso de agua.

- Al día siguiente se guardaron las placas en una caja histológica.

4.4 TINCIÓN SAFRANINA Y FAST GREEN

Los siguientes procedimientos se realizaron en una cámara de flujo laminar y las placas fueron colocadas en cajas Wheaton para lavados.

Eliminación del paraplast

- Se realizaron tres lavados de 10 minutos con xileno al 100%.

Rehidratación de los cortes

Las placas se lavaron con etanol en la siguiente secuencia:

- Un lavado de 5 minutos en etanol absoluto.
- Un lavado de 5 minutos en etanol al 94%.
- Un lavado de 5 minutos en etanol al 70%.

Tinción con Safranina

- Se colocaron las placas en una caja con la solución de safranina por dos días.
  Solución de Safranina**:** 3% de safranina disuelta en etanol al 50%.
- Después de los dos días de lavado se sacaron las placas y se dejó drenar el exceso de tinte.
- Se las lavó brevemente en etanol al 70%.

Tinción con Fast green FG

- Se tiñó por 20 segundos en una solución de 0,5% fast green en etanol al 95%.
- Se realizaron dos lavados en etanol al 95% por 5 minutos.
- Se realizaron dos lavados de etanol absoluto de 5 minutos.
- Se aclararon los tejidos por 2 minutos con etanol: xileno 1:1
- Se aclaró por 2 minutos con xileno al 100%.

- Se removió el exceso de xileno con papel absorbente, únicamente inclinando y tocando el filo de la placa.
- Se puso una gota de Bálsamo de Canadá sobre cada placa y se colocó un cubreobjetos sobre la muestra.
- Las placas se mantuvieron en la cámara de flujo laminar toda la noche, lejos de cualquier fuente de calor.

Se tomaron fotografías de seis cortes histológicos seleccionados al azar de la región media del endodermo de cada individuo para cada estadio, de ambas especies, en el microscopio Zeiss Axio Observer Z1, utilizando el aumento de 5x y la cámara AxioCamMR5. Las imágenes adquiridas se almacenaron en formato TIFF con el programa AxioVision.

4.5 ANÁLISIS DE IMÁGENES Y CUANTIFICACIÓN DE COLOR

Las cuantificaciones de las plaquetas de yema del endodermo se realizaron en las fotografías de los cortes histológicos con tinción safranina y FG, usando el software ImageJ.

Primero, se estimó el área total del endodermo (100%) de cada corte mediante un umbral de color. Después se realizó una deconvolución de color para generar imágenes (8 bits) separadas de los colores rojo y azul (tinción safranina y FG respectivamente). Se seleccionó la imagen de color rojo y se estimó únicamente el área con el color rojo más intenso (plaquetas con cuerpo cristalino completo); para esto, se usó la herramienta umbral automático que mide concentraciones de color, y se dividió el valor del umbral superior, generado automáticamente, para dos y se midió el área de las zonas seleccionas (National Institutes of Health, n.d.). Mediante una regla de tres, se calculó el porcentaje de plaquetas inactivas del endodermo nutricional de cada corte. Esta cuantificación se realizó en seis cortes de cada individuo y se calculó el promedio entre todos los cortes. El valor obtenido se utilizó como el valor de porcentaje de PY inactivas por individuo. Adicionalmente, se realizó una segunda cuantificación, donde se calculó el área de todas las regiones del endodermo que tienen color rojo, para esto se realizó el mismo proceso que se usó para la primera cuantificación, con la diferencia de que el valor del umbral superior ya no fue el

automático, sino que se lo estableció en 254, ya que este permite calcular todas las concentraciones de color rojo.

Para determinar si existen diferencias entre el porcentaje de plaquetas de yema inactivas de los individuos de cada especie y entre especies, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para cada estadio, donde se compararon los datos de tres individuos por estadio, en cada especie. Para realizar esto se utilizó el software SPSS versión 22.

5. RESULTADOS

5.1 DISECCIÓN DEL INTESTINO

El intestino de las especies *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus* difiere en su morfología al momento de la eclosión. Para describir la morfología del intestino al momento de la eclosión se realizaron disecciones a 12 individuos de *Espadarana prosoblepon* y a 10 individuos de *Hyloxalus elachyhistus.*

En *Espadarana prosoblepon* al momento de la eclosión el intestino se encuentra poco diferenciado y tiene gran cantidad de células endodermales. La diferenciación morfológica en la parte anterior del endodermo es mínima y apenas se puede distinguir una pequeña porción del intestino anterior (Fig. 1C y 1D). En la región posterior se puede distinguir el intestino y proctodeo. Aunque estas estructuras no están totalmente diferenciadas, se reconocen porque ya presentan una forma tubular y tienen menor cantidad de yema que en la región media (Fig. 1C y 1D). La porción del intestino posterior se observó en los 11 individuos disectados. En un individuo se observó únicamente la masa de yema. La formación del intestino posterior se inicia en la mitad derecha, vista ventral, en todos los individuos (Fig. 1C). La zona media del intestino al momento de la eclosión se encuentra poco diferenciada y tiene gran cantidad de yema con muchos vasos sanguíneos, los cuales se observan con claridad en la zona ventral. Esto se observó en el intestino de los 12 individuos (Fig. 1B-1D). En ninguno de los individuos disectados observamos la formación del páncreas, hígado o estómago.

En *Hyloxalus elachyhistus* al momento de la eclosión el intestino es alargado, enrollado y tiene poca cantidad de yema. Esto se observó en los 10 individuos disectados (Fig. 1F y 1G). El sistema digestivo está bastante diferenciado en la región anterior, donde el páncreas ya se encuentra formado (Fig. 1G y 1H). El páncreas está anclado a la región anterior del intestino y es transparente (Fig. 1H). En la región media del intestino hay remanentes de yema, distribuidos a lo largo de toda esta región (Fig. 1G y 1H). En las disecciones también se observó la formación del estómago e hígado.

5.2 CORTES HISTOLÓGICOS Y CONSUMO DE PLAQUETAS DE YEMA

Se obtuvieron secciones teñidas con safranina y fast green de los estadios 17, 18, 21, 22, 23, 24 y 25 de ambas especies (Fig. 2 y 3).

5.2.1 DIFERENCIACIÓN MORFOLOGÍA DEL ENDODERMO

En el endodermo de *Espadarana prosoblepon* no se observa una diferenciación estructural evidente desde el estadio 17 hasta el 21, en estos estadios únicamente se observa cambios en la coloración de rojo a azul, debido al consumo de las plaquetas de yema (Fig. 2C-2E). A partir del estadio 22 se puede observar diferenciación morfológica del endodermo. En este estadio la diferenciación inicia desde la parte más exterior del endodermo; se observa una capa de células más gruesas en la periferia que en el centro, lo cual es consistente con el patrón de consumo de las PY que también se inicia desde el contorno del endodermo hacia el centro (Fig. 2F). En el estadio 23 y 24 no hay mucha variación en la diferenciación con respecto al estadio 22, lo que si se observa es la disminución de color rojo conforme avanza el desarrollo (Fig. 2G - 2I). En el estadio 25 hay una diferenciación morfológica clara, en el centro del endodermo se forma el lumen intestinal, el cual está rodeado de una gran cantidad de yema (Fig. 2I).

En el endodermo de *Hyloxalus elachyhistus* no se observa mucha variación morfológica desde el estadio 17 hasta el 21, únicamente se observan cambios en la coloración debido al consumo de las plaquetas de yema (Fig. 3C-3E). En el estadio 22 la diferenciación inicia desde la parte más exterior del endodermo, se observa una capa de células más gruesas en la periferia que en el centro (Fig. 3F). Entre el estadio 22 y 23 no se observan diferencias estructurales con respecto al estadio 21, salvo la disminución de color rojo desde la periferia hasta el centro (Fig. 3F y 3G) En el estadio 24 hay diferenciación celular acelerada. Al inicio de este estadio la morfología del endodermo se parece a la de los estadios previos (22 y 23); tiene el endodermo completo, salvo la disminución de color rojo (Fig. 3H). A medida que se acerca al estadio 25 la diferenciación morfológica se precipita de tal manera que en el estadio 24.75 aproximadamente, se observa la formación del lumen intestinal (Fig.3I). En el estadio 25 hay alta diferenciación celular y el intestino se encuentra formado casi en su totalidad y tiene remanentes de yema en su interior (Fig 3J).

5.2.2 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE PLAQUETAS DE YEMA

La cuantificación de plaquetas inactivas se realizó en el software ImageJ. Se utilizaron seis cortes de cada individuo. La cuantificación se realizó con el objetivo de calcular el porcentaje de plaquetas con el cuerpo cristalino intacto (plaquetas totalmente rojas). Para esto se realizó una deconvolución de color que sirve para separar los colores de las muestras en distintas imágenes, en este caso se separó el color rojo y azul. Una vez separados los colores se utilizó la imagen del color rojo y se cuantificaron únicamente las zonas con el color rojo más intenso (ver Materiales y Métodos). Con los datos obtenidos realizamos un gráfico de barras donde se observa que la cantidad de PY inactivas del endodermo de las dos especies disminuye conforme avanza el desarrollo (Fig. 4).

Para comparar, se realizó una segunda cuantificación en la que se incluyeron las plaquetas inactivas y parcialmente activas, es decir, estima todas las regiones que tengan la presencia de color rojo (Fig. 5). El gráfico de barras muestra que la cantidad varía poco entre los estadios y entre ambas especies (Fig.5).

5.2.3 CONSUMO DE PLAQUETAS DE YEMA DEL ENDODERMO

El patrón del consumo de las plaquetas de yema del endodermo es parecido entre *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus*. En ambas especies el consumo de las PY se inicia desde la región exterior del endodermo hacia la región central (Fig. 2 y 3) y la cantidad de plaquetas de yema inactivas disminuye en cada estadio (Fig. 4). En *Espadarana prosoblepon* el consumo de plaquetas de yema es apenas más rápido que en *Hyloxalus elachyhistus* (Fig.4).

En *Espadarana prosoblepon* el consumo de plaquetas de yema se inicia antes del estadio 17; en este estadio se calculó un promedio de plaquetas inactivas de 70,83% (Tabla 1). La cantidad de plaquetas de yema inactivas del endodermo desciende en cada estadio y se consume desde afuera hacia adentro (Fig. 2 y 4). Llegando a tener un porcentaje de área con PY inactivas de 21.14 en el estadio 23 (Tabla 1).

En *Hyloxalus elachyhistus* el consumo de plaquetas de yema también se inicia antes del estadio 17, ya que en este estadio hay un promedio de área con plaquetas inactivas de 63.41% (Tabla 1). Al igual que en *Espadarana prosoblepon*, las PY en esta especie se consumen desde la región exterior del endodermo hacia la interior y la cantidad de plaquetas de yema inactivas del endodermo desciende en cada estadio (Fig. 3 y 4). En el estadio 23 el promedio de área con plaquetas inactivas es de 28.86% (Tabla.1).

Al comparar el porcentaje de PY inactivas de ambas especies se observa que el área con plaquetas de yema inactivas es más baja en la mayoría de estadios de *Espadarana prosoblepon* que en los de *Hyloxalus elachyhistus* (Tabla. 1). Sin embargo, al comparar estadísticamente el porcentaje de PY inactivas en cada estadio, se encontró que para el valor p de 0.05 existen diferencias únicamente en los estadios 21 y 22. En los demás estadios (17, 18 y 23) estas diferencias no son significativas (Fig. 4) (Anexo 5). Mientras que para el valor p de 0.01 no existen diferencias en el porcentaje de PY inactivas entre los estadios de *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus*.

6. DISCUSIÓN

Existe poca información sobre la tasa y patrón de consumo de la yema en embriones de anuros. Únicamente existen dos estudios previos que describen el patrón de consumo de plaquetas de yema y estos se han realizado en *Xenopus laevis* (Jorgensen et al., 2009; Selman y Pawsey, 1965). En este estudio se compara el patrón de consumo de PY del endodermo de *Espadarana prosoblepon* que es una especie con desarrollo rápido y de *Hyloxalus elachyhistus,* que tiene desarrollo lento. Además, se analiza la relación que existe entre el patrón del consumo de plaquetas con la formación del intestino.

6.1 MORFOLOGÍA DEL INTESTINO

En este estudio se describe y compara la morfología del intestino *Espadarana prosoblepon* que es una especie con desarrollo rápido y de *Hyloxalus elachyhistus* que tiene desarrollo lento, en el momento de la eclosión. Cuando *Espadarana prosoblepon* eclosiona tiene un intestino muy poco diferenciado y con una gran masa de yema altamente vascularizada (Fig. 1C-1D). Mientras que el intestino de *Hyloxalus elachyhistus* está más desarrollado. Al momento de la eclosión el intestino es elongado, enrollado y tiene remanentes de yema (Fig. 1F-1G).

Al comparar la morfología de los intestinos de estas dos especies con el desarrollo del intestino de *Xenopus laevis,* descrito por Chalmers y Slack (1998), encontramos que el intestino *X. laevis* se desarrolla más rápido, que en *Espadarana prosoblepon*, e *Hyloxalus elachyhistus*. La formación del intestino en *Xenopus laevis* se inicia en el estadio 40, el cual equivale al estadio 20, aproximadamente, de las especies en este estudio (Hervas et al., 2015; Salazar-Nicholls y del Pino, 2015), mientras que en *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus,* el desarrollo del intestino se inicia en el estadio 25 y 24 respectivamente, cuando se forma el lumen intestinal.

Al momento de la eclosión, el intestino de *Espadarana prosoblepon* está menos desarrollado que el intestino *Xenopus laevis* en las etapas más tempranas de desarrollo descritas por Chalmers y Slack (1998). Esto, debido a que en el estadio 40/41 de *Xenopus laevis* el páncreas, hígado y estómago ya se están desarrollando y el intestino, está más

elongado que el descrito para *Espadarana prosoblepon* en estadio 25, donde en ninguno de los individuos disectados, se observó el páncreas, hígado o estómago (Fig. 1C y 1D). El intestino de *Hyloxalus elachyhistus* al momento de la eclosión se asemeja más al intestino presente en *X. laevis* a los 4 días de desarrollo. En ambas especies el intestino está elongado y enrollado y tiene remanentes de yema, además de tener el páncreas e hígado formados (Fig. 1H).

La formación del intestino en *Xenopus laevis*, al igual que en *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus*, se inicia del tubo intestinal temprano que se estrecha y alarga, al mismo tiempo que sucede una aparente remodelación del endodermo. En *Xenopus laevis* el inicio del alargamiento intestinal es conducido casi exclusivamente por el reordenamiento celular, ya que hay muy poca división en las células del endodermo (Muller, Prather y Nascone-Yoder, 2003; Reed et al., 2009; Womble et al., 2016). La elongación del intestino se produce por el mecanismo denominado intercalación radial, donde las células del endodermo únicamente se reorganizan para formar el tubo digestivo. En los embriones de *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus* al parecer también hay intercalación radial durante la elongación del intestino, ya que el tubo intestinal primitivo de las dos especies es un cilindro sólido lleno de células de endodermo, el cual aumenta en longitud y disminuye en grosor a medida que se desarrolla. Chalmers y Slack (2000) realizaron un mapa de destino celular del endodermo de *Xenopus laevis* y describieron que las células más centrales del endodermo del tubo intestinal primitivo se intercalan radialmente durante la morfogénesis del intestino. A medida que este se alarga, el número de capas de células del endodermo (4 a 5 células), se reorganizan en el eje antero-posterior formando una sola capa de células en el epitelio. La intercalación de las células centrales y el adelgazamiento del epitelio proporcionan un área de mayor superficie que sirve para que el intestino incremente su longitud (Chalmers y Slack, 2000; Reed et al., 2009; Womble et al., 2016)

En *Espadarana prosoblepon* el intestino, al momento de la eclosión, aún no se ha estirado en su totalidad y tiene una gran cantidad de células endodermales. Si el mecanismo de elongación es la intercalación radial, se esperaría que todas las células del endodermo se reorganicen hasta que el intestino alcance su longitud máxima. En *Hyloxalus elachyhistus* al momento de la eclosión, el intestino es largo, enrollado y todavía tiene yema. Si el

mecanismo de intercalación radial actúa sobre la elongación del intestino en esta especie, también se esperaría que las células del endodermo restantes, se intercalen con las demás que se encuentran formando el epitelio. Para comprobar si el mecanismo de intercalación es el encargado de la elongación del intestino de estas dos especies, se tiene que realizar un mapa de destino celular del endodermo.

Las especies de centrolénidos cuando eclosionan, por lo general no tienen el intestino formado y, por lo tanto, no pueden comer; sin embargo, pueden sobrevivir hasta que se puedan alimentar. Delia et al., (2018) reportan que los individuos de varias especies de centrolénidos que eclosionan antes de tiempo, al parecer se alimentan del endodermo. En *Eleutherodactylus coqui,* que es una especie con desarrollo directo, se ha descrito otro tipo de células endodermales que sirven únicamente como fuente nutricional y que no llegan a formar parte del epitelio del tubo digestivo (Buchholz et al., 2007; Elinson, 2009; Karadge y Elinson, 2013). Se sabe que las plaquetas de yema son organelas que están presentes en todas las células de anfibios y que aportan grandes cantidades de nutrientes, sin embargo, hay la posibilidad de que en *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus* algunas células endodermales sean consumidas totalmente para aportar nutrientes, como sucede en *Eleutherodactylus coqui*.

6.2 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE PLAQUETAS DE YEMA INACTIVAS

En ambas cuantificaciones el porcentaje de áreas de color rojo del endodermo, es menor en *Espadarana prosoblepon.* Además, se observa que la cantidad de rojo disminuye en cada estadio, aunque muy poco, pero eso nos demuestra que efectivamente las plaquetas pierden afinidad por la safranina. Esta pérdida de afinidad indica que las plaquetas de yema se están consumiendo y liberando nutrientes, que son necesarios para el crecimiento y la diferenciación morfológica.

Para establecer el método de cuantificación del porcentaje de consumo de las PY se realizaron dos tipos de cuantificaciones. En la primera únicamente se calculó el porcentaje de área del endodermo con el color rojo de mayor concentración. La segunda cuantificación se realizó para comprobar que la primera, que cuantificaba únicamente las áreas más rojas,

era correcta. En la segunda cuantificación se calculó toda el área del endodermo que tiene tinción de color rojo, independientemente de su concentración.

Para realizar la cuantificación se realizó una deconvolución de color. La deconvolución de color es un método utilizado para transformar imágenes a color de muestras biológicas teñidas en imágenes separadas de 8-bits que representan las diferentes concentraciones de los colores (Haub y Meckel, 2015). La utilización de la deconvolución de color fue una modificación realizada al método estándar descrito por el National Institutes of Health, donde las imágenes se transforman a escala de grises. Se realizó esta modificación porque en las imágenes de escalas de grises no se puede calcular los colores por su concentración, por lo que, los resultados obtenidos en dichas imágenes, resultarían similares a los de la segunda cuantificación. Esto no nos permitiría hacer el seguimiento del consumo de las plaquetas de yema.

La tinción de safranina y fast green tiñen las estructuras de las plaquetas de yema; el cuerpo cristalino, se tiñe con safranina y la capa granular periférica, se tiñe con fast green. Cuando se inicia el consumo de las PY esta capa granular desaparece, dejando únicamente el cuerpo cristalino intacto, el cual tiene alta afinidad por la safranina. A medida que el cuerpo cristalino pierde sus grupos fosfato, también pierde esta afinidad por el tinte, por consiguiente, disminuye el color rojo (Selman y Pawsey, 1965). Debido al método utilizado para la cuantificación únicamente, se estimaron las zonas con el color rojo con mayor concentración, que nos indica la presencia de cuerpos cristalinos completos. El método de cuantificación utilizado no nos permite distinguir si la presencia de color azul se debe a la presencia de la capa periférica granular de la plaqueta o a que el cuerpo cristalino ya se está consumiendo. Con la primera cuantificación no es posible distinguir si las plaquetas tienen o no la capa periférica granular, pero al menos se pueden diferenciar los cuerpos cristalinos completos, que es de donde se obtienen los principales aminoácidos para la morfogénesis (Selman y Pawsey, 1965). La presencia de tinción azul en la capa granular de las plaquetas inactivas puede ser la razón por la cual, en los primeros estadios de organogénesis, no tenemos valores de plaquetas inactivas aproximados a 100% (Fig. 5). Para comprobar esto se tiene que hacer una identificación de cada plaqueta y observar cuales carecen de la capa granular.

En los trabajos de Selman y Pawsey (1965) y Jorgensen et al. (2009) las cuantificaciones se realizaron de forma manual contando cada una de las plaquetas e indentificando si están activas e inactivas. En el presente trabajo la cuantificación de hizo de forma más automática con la ayuda del software ImageJ. A pesar de que se obtuvieron resultados similares a los esperados, basandonos en los trabajos previos (Jorgensen et al., 2009; Selman y Pawsey, 1965), se tiene que realizar el conteó manual y se tienen que comparar los resultados obtenidos con los que se presentan en este estudio. Esto con la finalidad de comprobar cuanta variación existe entre los dos métodos de cuantificación.

6.3 CONSUMO DE PLAQUETAS DE YEMA DEL ENDODERMO

En la mayoría de animales las plaquetas de yema son la principal fuente de nutrientes durante el desarrollo embrionario y su consumo está directamente relacionado con la diferenciación morfológica (Elinson y del Pino, 2012; Selman y Pawsey, 1965). Poco se conoce sobre los cambios metabólicos durante el desarrollo embrionario en anuros.

En este estudio se realizó la cuantificación de la tasa de consumo de plaquetas de yema del endodermo de *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus*, para determinar si existen diferencias entre las especies de desarrollo rápido y desarrollo lento. El patrón de consumo de las PY de ambas especies es similar. En ambas especies el consumo de PY se inicia antes del estadio 17 y la cantidad de plaquetas de yema inactivas disminuye conforme avanza el desarrollo (Fig. 4). En la especie de desarrollo rápido la tasa de consumo de PY es mayor que la de *Hyloxalus elachyhistus.* Sin embargo, no existen diferencias altamente significativas en el consumo de PY al comparar cada estadio ($p>0.01$) (Anexo. 5) La cuantificación de las PY inactivas se realizó hasta el estadio 23, porque en los estadios posteriores no se puede comparar la tasa de consumo de PY entre las especies debido a que ya hay diferenciación en el endodermo de una de las especies. En el estadio 24 en *Hyloxalus elachyhistus* se forma el lumen intestinal (Fig. 3I) y en *Espadarana prosoblepon* el endodermo todavía no se diferencia (Fig. 2I).

En el estudio realizado por Selman y Pawsey en 1965, se describe el consumo de PY de embriones de *Xenopus laevis.* Las primeras plaquetas que presentan consumo están presentes en las células endodermales que revisten el arquénteron, entre los estadios 14 y 20

(14 a 16 en *E. prosoblepon* e *H. elachyhistus*). En las demás células del endodermo no se observa consumo de PY hasta después del estadio 34 (19 en *E. prosoblepon* e *H. elachyhistus*). En el estadio 40 (20 en *E. prosoblepon* e *H. elachyhistus*) se registra un incremento de consumo de las plaquetas de yema, en el esófago y el intestino (27% de plaquetas activas), en ese momento el intestino ya se está formando. En el estadio 45 (25 en *E. prosoblepon* e *H. elachyhistus*) la mayoría de plaquetas de yema han sido consumidas en su totalidad, solo un 4% de plaquetas presentaba algún grado de tinción de color rojo.

Jorgensen et al. (2009), también realizaron un estudio de cuantificación del consumo PY en *Xenopus laevis*; en esta investigación se utilizaron anticuerpos para reconocer las plaquetas de yema e identificar cuales ya están activas. El anticuerpo anti-Seryp se utilizó para marcar la capa granular y el anticuerpo anti-Vtg para marcar los cuerpos cristalinos de las plaquetas. Las plaquetas sin Seryp se consideraron activas. En este estudio se evaluó el patrón de consumo de las PY desde el estadio 9, equivalente a la blástula, hasta el estadio 26/27 (yema de la cola) (estadio 18 en *E. prosoblepon* e *H. elachyhistus*). Se describe el consumo de las plaquetas de yema de distintos tejidos incluidos el endodermo. El primer estadio en el cual hay PY activas en las células del endodermo, es en el estadio 12 (gastrulación), con un porcentaje de 1.5% de PY activas y se incrementa hasta 3.2% en el estadio temprano de yema de la cola (estadio 17 en *E. prosoblepon* e *H. elachyhistus*). Después de este estadio el porcentaje de PY aumenta hasta 9.3% en el estadio 26/27 (equivalente al estadio 18). Las células que rodean el arquénteron no fueron consideradas como parte del endodermo, pero su consumo de PY si fue cuantificado.

Entre los dos estudios previos de Selman y Pawsey (1965) y Jorgensen et al. (2009), existen diferencias, principalmente entre el estadio en el cual se registra el inicio del consumo de PY. En el trabajo de Selman y Pawsey (1965) el primer estadio donde hay consumo de PY en las células del endodermo es el estadio 40 (20 en *E. prosoblepon* e *H. elachyhistus*), sin tomar en cuenta las células que rodean el arquénteron. Mientras que en estudio de Jorgensen et al. (2009) en la gastrulación es donde hay las primeras PY activas en el endodermo. En ese estudio el máximo porcentaje de consumo de PY se registra en el estadio 26/27 (18 en *E. prosoblepon* e *H. elachyhistus*), y esto se debe principalmente a que solo se cuantificó hasta ese estadio. Por lo cual no hay como comparar el consumo de PY con los valores de estadios posteriores registrados por Selman y Pawsey (1965).

En *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus* el consumo de PY se inicia antes del estadio temprano de yema de cola, al igual que lo descrito para *Xenopus laevis* por Jorgensen et al. (2009), lo cual no coincide con lo registrado por Selman y Pawsey (1965), donde el consumo de PY se inicia en el estadio 40 (20 en *E. prosoblepon* e *H. elachyhistus*), con un porcentaje de PY activas del 27% en la zona media-anterior; este valor se aproxima al porcentaje de PY activas en *Espadarana prosoblepon* en el estadio 17. En los estadios 17 y 18 de *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus* el consumo de PY del endodermo es mayor que el registrado por Jorgensen et al. (2009). En los siguientes estadios se observa una disminución de plaquetas inactivas, lo que indica que las plaquetas de yema se están consumiendo. El patrón de consumo de PY registrado en las especies de este estudio concuerda con el patrón descrito por Selman y Pawsey (1965), donde hay un aumento de PY activas conforme avanza el desarrollo.

Los estudios de Selman y Pawsey (1965) y Jorgensen et al. (2009), tienen varias diferencias en el patrón de consumo de PY, a pesar de que se utilizó la misma especie, principalmente entre el estadio cuando se inicia el consumo de PY en el endodermo. Tales diferencias se pueden producir por el método que utilizaron para identificar las PY. El método utilizado por Jorgensen et al. (2009) es más específico, porque reconoce únicamente las plaquetas de yema mediante el uso de anticuerpos específicos para proteínas que solo se expresan en las PY. La tinción utilizada por Selman y Pawsey (1965) también sirve para identificar las PY, sin embargo, no tiñe exclusivamente estas organelas. La safranina también tiñe cromosomas y nucléolos, el fast green los cromosomas y parte de los citoplasmas. Para comprobar qué tan específica fue la metodología utilizada en este estudio se tiene que analizar el patrón de consumo de plaquetas de yema utilizando los anticuerpos anti-Seryp y anti-Vtg y comparar con los resultados hasta el momento reportados para *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus*.

Es necesario realizar el análisis del consumo de plaquetas de yema de individuos completos de todos los estadios de desarrollo de *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus.* Esto permitirá tener más información acerca del metabolismo en especies de desarrollo rápido y lento. Además de ampliar el conocimiento que se tiene del desarrollo en anuros.

6.4 TASA DE CONSUMO DE PLAQUETAS DE YEMA Y LA DIFERENCIACIÓN MORFOLOGÍCA. IMPLICACIONES ECOLÓGICAS

Las regiones media y posterior del endodermo, se encargan de formar el intestino (Gilbert, 2005; Womble et al., 2016). En *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus* la morfología del endodermo varía, principalmente a partir del estadio 24, cuando se empieza a diferenciar el intestino. Al momento de la eclosión, la morfología del intestino de ambas especies es diferente.

Espadarana prosoblepon al momento de la eclosión tiene una gran masa de yema, por lo que se esperaba que la cantidad de PY inactivas fuese mayor en esta especie, que en *Hyloxalus elachyhistus* que tiene poca cantidad de yema en el intestino. Sin embargo, se encontró que el porcentaje de plaquetas de yema inactivas de los estadios analizados no tiene diferencias significativas ($p>0.01$) entre ambas especies; incluso, en *Espadarana prosoblepon,* el porcentaje de PY inactivas es apenas menor que *Hyloxalus elachyhistus* (Fig. 4).

Debido a esto es posible que los nutrientes obtenidos de las plaquetas de yema del endodermo sean utilizados de maneras diferentes en las dos especies estudiadas. En *Hyloxalus elachyhistus* posiblemente los nutrientes sean utilizados para la diferenciación del intestino, puesto que hay pocas PY activas, poca cantidad de células del endodermo y un intestino alargado y enrollado. Por otra parte, en *Espadarana prosoblepon* hay gran cantidad de células del endodermo, pero existen pocas PY inactivas y el intestino apenas se está diferenciando.

Estas diferencias se pueden deber al tiempo de desarrollo de ambas especies. Debido a que *Hyloxalus elachyhistus* tiene cuidado parental y desarrollo lento, donde la elongación del notocordio se inicia después de la gastrulación, dispone de más tiempo para desarrollar el intestino antes de la eclosión. Mientras que *Espadarana prosoblepon,* que es una especie de desarrollo rápido porque la gastrulación se sobrepone con la elongación del notocordio, tiene menos tiempo para formar su intestino. Los estadios de desarrollo de estas especies no se definen por el tiempo de desarrollo, sino por caracteres. Por lo cual, se requiere comparar

el tiempo de desarrollo del intestino de ambas especies (Hervas et al., 2015; Salazar-Nicholls y del Pino, 2015) .

Además, la evidencia también sugiere que los nutrientes liberados por las PY no se usan exclusivamente para la diferenciación del intestino, sino que también pueden ser empleados en otras funciones. Jogensen (2008) y Jorgensen et al. (2009) proponen que, durante las últimas etapas de la embriogénesis, los nutrientes de las plaquetas de yema son liberados en las células del intestino, migran por la sangre y son absorbidos por los tejidos en crecimiento. Por otra parte, Selman y Pawsey (1965) indican que existen tejidos donde las PY proporcionan más cantidad de nutrientes que los requeridos para la morfogénesis.

En *Espadarana prosoblepon* la masa de yema presente en el intestino al momento de la eclosión está altamente vascularizada, lo que sugiere que los nutrientes liberados por las PY son transportados por el torrente sanguíneo hacía otros tejidos u órganos que los requieran. Proponemos que los nutrientes liberados por las PY de las células del endodermo en *Espadarana prosoblepon* pueden ser utilizados para terminar de formar los órganos que son necesarios para que el individuo sobreviva después de eclosionar.

La eclosión es un proceso bastante plástico. En centrolénidos, el tiempo de eclosión puede variar dependiendo de si existe riesgo de deshidratación, predadores terrestres, hongos patógenos o si hay cuidado parental (Delia et al., 2018; Warkentin, 2011). En dendrobátidos la eclosión únicamente está influenciada por el cuidado parental (Warkentin, 2011). Existen dos mecanismos por los cuales se produce la eclosión. El proceso químico, en el cual se desarrollan glándulas en la cabeza que liberan enzimas proteolíticas que degradan la membrana del huevo y el proceso mecánico donde se produce la ruptura de las membranas por la actividad muscular (Warkentin, 2011). Los dendrobátidos por lo general no adelantan su eclosión porque sus padres se encargan de mantener a los embriones en condiciones óptimas hasta que culmine su desarrollo (Warkentin, 2011). Por otro lado, en los centrolénidos el tiempo de eclosión sí varía. Por lo general se reduce el tiempo en que eclosionan los renacuajos cuando están bajo alguna amenaza.

Cuando los embriones eclosionan deben estar listos para sobrevivir fuera de las capas embrionarias, para lo cual necesitan tener varios órganos funcionales. Los embriones de

Espadarana prosoblepon e *Hyloxalus elachyhistus* al eclosionar, son liberados en cuerpos de agua (Coloma, 1995; Delia et al., 2010). Debido a esto, necesitan desarrollar órganos que les permitan realizar el intercambio gaseoso en este medio. Las branquias y la piel son los órganos que se encargan de realizar el intercambio gaseoso en los embriones de anuros. Al momento de la eclosión, estos órganos tienen que ser funcionales. *Agalychnis callydrias,* puede adelantar la eclosión al igual que los centrolénidos (Warkentin, 2002, 2011). En esta especie se ha descrito que las branquias están desarrolladas en cualquiera de los estadios al momento de la eclosión y estas sufren varias modificaciones dependiendo de la cantidad de oxígeno y el estadio de desarrollo (Warkentin, 2002). *Espadarana prosoblepon* también puede adelantar la eclosión, por lo tanto, debe tener órganos funcionales que le permitan respirar cuando eclosiona. Por esta razón proponemos que uno de los posibles destinos de los nutrientes liberados por las PY del endodermo de *Espadarana prosoblepon* sea para la formación de los órganos del sistema respiratorio. Además, los renacuajos tienen que estar listos para nadar cuando eclosionan, por lo que también, parte de los nutrientes, se puede dirigir hacia el desarrollo de estructuras que permitan la natación, como la cola. En muchas especies el sistema digestivo no se encuentra formado cuando los embriones eclosionan (Delia et al., 2018; Warkentin, 2002), lo que indica que al momento de la eclosión este sistema todavía no es esencial para la supervivencia de los renacuajos.

En el estadio 23 de ambas especies, más del 50% del área del endodermo tiene tinción roja (Fig. 5), lo que nos indica que hay plaquetas que a pesar de estar activas todavía pueden aportar con nutrientes. Para saber cuál es el porcentaje de plaquetas de yema que pueden aportar nutrientes después de su activación es necesario realizar un conteo manual donde las cuantificaciones se basen en la morfología y color de cada una. También se tiene que realizar la cuantificación del consumo de PY en individuos eclosionados de ambas especies para saber cuál es el porcentaje de PY que todavía se pueden aportar con nutrientes para los renacuajos.

7. CONCLUSIONES

Este estudio aporta con más datos sobre el metabolismo en embriones de anuros, puesto que solo existen los estudios de Jorgensen et al. (2009) y de Selman y Pawsey (1965) que describen el consumo de las plaquetas de yema en *Xenopus laevis*.

Al determinar el consumo de plaquetas de yema del endodermo de *Espadarana prosoblepon* (Centrolenidae) y de *Hyloxalus elachyhistus* (Dendrobatidae), mediante tinción de safranina y fast green, se concluye que la tasa de consumo de PY del endodermo no varía entre los estadios de ambas especies, a pesar de que al momento de la eclosión la morfología del intestino de *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus* es diferente.

El tiempo de formación del intestino de ambas especies es diferente, debido a caracteres ecológicos específicos de cada una. *Hyloxalus elachyhistus* en el estadio 25 ya tiene desarrollado el intestino, mientras que *Espadarana prosoblepon* en ese estadio apenas comienza a formar el lumen intestinal.

Los resultados obtenidos sugieren que los nutrientes de las PY del endodermo de *Espadarana prosoblepon* no son utilizados exclusivamente para formar el intestino.

Metodológicamente hablando, la cuantificación automática de las PY realizada en el software ImageJ permite optimizar el tiempo experimental e incrementar las muestras analizadas lo cual valida su utilización ya que proporciona resultados que concuerdan con lo esperado, de acuerdo con estudios previos con otras especies de anuros.

Para entender mejor la morfogénesis de los embriones de anuros se tienen que realizar más estudios de la tasa del consumo de PY en otras especies.

8. RECOMENDACIONES

Realizar más repeticiones de cada estadio de ambas especies.

Realizar la cuantificación manual para comparar con los valores obtenidos en este estudio.

Describir el patrón de consumo de plaquetas de yema en todo el individuo, para comprender mejor la formación de todos los órganos en estas especies.

Determinar el patrón del consumo de yema en estadios más tempranos (1-16), para saber el momento exacto del desarrollo en que se inicia el consumo de PY del endodermo en ambas especies.

Realizar cortes histológicos en las etapas posteriores a la eclosión para entender qué sucede con los remanentes de yema en los renacuajos.

Realizar los mismos análisis de este estudio con anticuerpos anti – Vtg y anti - Seryp, para cuantificar el consumo de plaquetas de yema y comparar con los resultados ya obtenidos.

Realizar un estudio donde se describa el destino celular del endodermo en ambas especies.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Buchholz, D. R., Singamsetty, S., Karadge, U., Williamson, S., Langer, C. E. y Elinson, R. P. (2007). Nutritional endoderm in a direct developing frog: A potential parallel to the evolution of the amniote egg. *Developmental Dynamics*, *236*(5), 1259-1272. https://doi.org/10.1002/dvdy.21153

Chalmers, A. D. y Slack, J. M. W. (1998). Development of the gut in *Xenopus laevis*. *Developmental Dynamics*, *521*(October 1997), 509-521. Recuperado de http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmedyid=9707324yretmode=refycmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/A53F5BC9-6367-4F60-AE37-116C7C5DFA92

Chalmers, A. D. y Slack, J. M. W. (2000). The *Xenopus* tadpole gut: fate maps and morphogenetic movements. *Development (Cambridge, England)*, *127*(2), 381-392.

Coloma, L. A. (1995). Ecuadorian frogs of the genus *Colostethus* (Anura: Dendrobatidae). Natural History Museum, University of Kansas.

Delia, J., Cisneros-Heredia, D. F., Whitney, J. y Murrieta-Galindo, R. (2010). Observations on the Reproductive Behavior of a Neotropical Glassfrog, *Hyalinobatrachium fleischmanni* (Anura: Centrolenidae). *South American Journal of Herpetology*. https://doi.org/10.2994/057.005.0101

Delia, J., Rivera-Ordonez, J. M., Salazar-Nicholls, M. J. y Warkentin, K. M. (2018). Hatching plasticity and the adaptive benefits of extended embryonic development in glassfrogs. *Evolutionary Ecology*. https://doi.org/10.1007/s10682-018-9963-2

Elinson, R. (2009). Nutritional endoderm: A way to breach the holoblastic-meroblastic barrier in tetrapods. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *312*(6), 526-532. https://doi.org/10.1002/jez.b.21218

Elinson, R. y del Pino, E. M. (2012). Developmental diversity of amphibians. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *1*(3), 345-369. https://doi.org/10.1002/wdev.23

Elinson, R., Stewart, J. R., Bonneau, L. J. y Blackburn, D. G. (2014). Amniote yolk sacs: Diversity in reptiles and a hypothesis on their origin. *International Journal of Developmental Biology*, *58*(10-12), 889-894. https://doi.org/10.1387/ijdb.140239db

Fagotto, F. y Maxfield, F. R. (1994). Changes in yolk platelet pH during *Xenopus laevis* development correlate with yolk utilization. A quantitative confocal microscopy study. *Journal of Cell Science*, *107*, 3325-3337.

Frost Darrel. (2019). Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (Base de datos en línea). American Museum of Natural History, Nueva York, EEUU. Disponible en: http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html. (15 de febrero de 2019).

Gilbert, S. (2005). Bilogía del Desarrollo. *Editorial Médica Panamericana*. https://doi.org/9789500608695

Grant, B. y Hirsh, D. (1999). Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Molecular Biology of the Cell*. https://doi.org/10.1091/mbc.10.12.4311

Guayasamin, J. M., Varela-Jaramillo, A. y Frenkel, C. (2018). *Espadarana prosoblepon*. Recuperado de https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Espadarana prosoblepon,

Haub, P. y Meckel, T. (2015). A model based survey of colour deconvolution in diagnostic brightfield microscopy: Error estimation and spectral consideration. *Scientific Reports*, *5*(February), 1-15. https://doi.org/10.1038/srep12096

Hayakawa, H., Andoh, T. y Watanabe, T. (2006). Precursor structure of egg proteins in the coral *Galaxea fascicularis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.116

Hervas, F. y del Pino, E. (2013). Desarrollo neural, somitogénesis y morfología interna de los embriones de *Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates auratus* (Anura: Dendrobatidae). *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, *34*(1-2), 99-102.

Hervas, F., Torres, K. P., Montenegro-Larrea, P. y del Pino, E. M. (2015). Development and gastrulation in *Hyloxalus vertebralis* and *Dendrobates auratus* (Anura: Dendrobatidae). *Amphib. Reptile Conserv*, *8*(1), 1725. Recuperado de https://www.puce.edu.ec/documentos/2015/2015-hervas-etal-ARC_8_1_121-135_e90_low_res.pdf

Jorgensen, P. (2008). Yolk. *Current Biology*, *18*(3), R103-R104. https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.037

Jorgensen, P., Steen, J. A. J. A. J., Steen, H. y Kirschner, M. W. W. (2009). The mechanism and pattern of yolk consumption provide insight into embryonic nutrition in *Xenopus*. *Development*, *136*(9), 1539-1548. https://doi.org/10.1242/dev.032425

Karadge, U. y Elinson, R. P. (2013). Characterization of the nutritional endoderm in the direct developing frog *Eleutherodactylus coqui*. *Development Genes and Evolution*, *223*(6), 351-362. https://doi.org/10.1007/s00427-013-0451-y

Komazaki, S., Tanaka, N. y Nakamura, H. (2002). Regional differences in yolk platelet degradation activity and in types of yolk platelets degraded during early amphibian embryogenesis. *Cells Tissues Organs*, *172*(1), 13-20. https://doi.org/10.1159/000064388

Muller, J. K., Prather, D. R. y Nascone-Yoder, N. M. (2003). Left-Right Asymmetric Morphogenesis in the *Xenopus* Digestive System. *Developmental Dynamics*. https://doi.org/10.1002/dvdy.10415

National Institutes of Health. (s. f.). Quantifying Stained Liver Tissue. Recuperado de https://imagej.nih.gov/ij/docs/examples/stained-sections/index.html

Pantin. (1948). Microscopy for zoologists. Recuperado 23 de diciembre de 2018, de https://archive.org/details/MicroscopyForZoologists/page/n3

Pérez, O. (2019). Manual de laboratorio de Biología del Desarrollo. No publicado.

Reed, R. A., Womble, M. A., Dush, M. K., Tull, R. R., Bloom, S. K., Morckel, A. R., … Nascone-Yoder, N. M. (2009). Morphogenesis of the primitive gut tube is generated by Rho/ROCK/Myosin II-mediated endoderm rearrangements. *Developmental Dynamics*. https://doi.org/10.1002/dvdy.22157

Roth, T. F. y Porter, K. R. (1964). Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. L. *The Journal of cell biology*. https://doi.org/10.1083/jcb.20.2.313

Rugh, R. (1962). Experimental embryology: techniques and procedures. Burgess Pub. Co.

Salazar-Nicholls, M. J. y del Pino, E. M. (2015). Early development of the glass frogs *Hyalinobatrachium fleischmanni* and *Espadarana callistomma* (Anura: Centrolenidae) from cleavage to tadpole hatching. *Amphibian y Reptile Conservation*, *8*(1), 89-106.

Selman, G. G. y Pawsey, G. J. (1965). The utilization of yolk platelets by tissues of *Xenopus* embryos studied by a safranin staining method. *Embryol. exp. Morph*, *14*(2), 191-212.

Vargas, A. y del Pino, E. M. (2017). Analysis of cell size in the gastrula of ten frog species reveals a correlation of egg with cell sizes, and a conserved pattern of small cells in the marginal zone.

Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution. https://doi.org/10.1002/jez.b.22685

Wallace, R. A. (1963). Studies on Amphibian Yolk. Iv. An analysis of the main-body component of yolk platelets. *Biochimica et Biophysica Acta*, *74*, 505-518. Recuperado de https://eurekamag.com/research/050/402/050402089.php

Wallace, R. A. y Bergink, E. W. (1974). Amphibian vitellogenin: Properties, hormonal regulation of hepatic synthesis and ovarian uptake, and conversion to yolk proteins. *Integrative and Comparative Biology*. https://doi.org/10.1093/icb/14.4.1159

Warkentin, K. M. (2002). Hatching timing, oxygen availability and external gill regression in the tree frog, *Agalychnis callidryas*. *Physiological and Biochemical Zoology*, *75*(2), 155-164. https://doi.org/10.1086/339214

Warkentin, K. M. (2011). Plasticity of hatching in amphibians: Evolution, trade-offs, cues and mechanisms. *Integrative and Comparative Biology*, *51*(1), 111-127. https://doi.org/10.1093/icb/icr046

Womble, M., Pickett, M. y Nascone-Yoder, N. (2016). Frogs as integrative models for understanding digestive organ development and evolution. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *51*, 92-105. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.02.001

10. FIGURAS

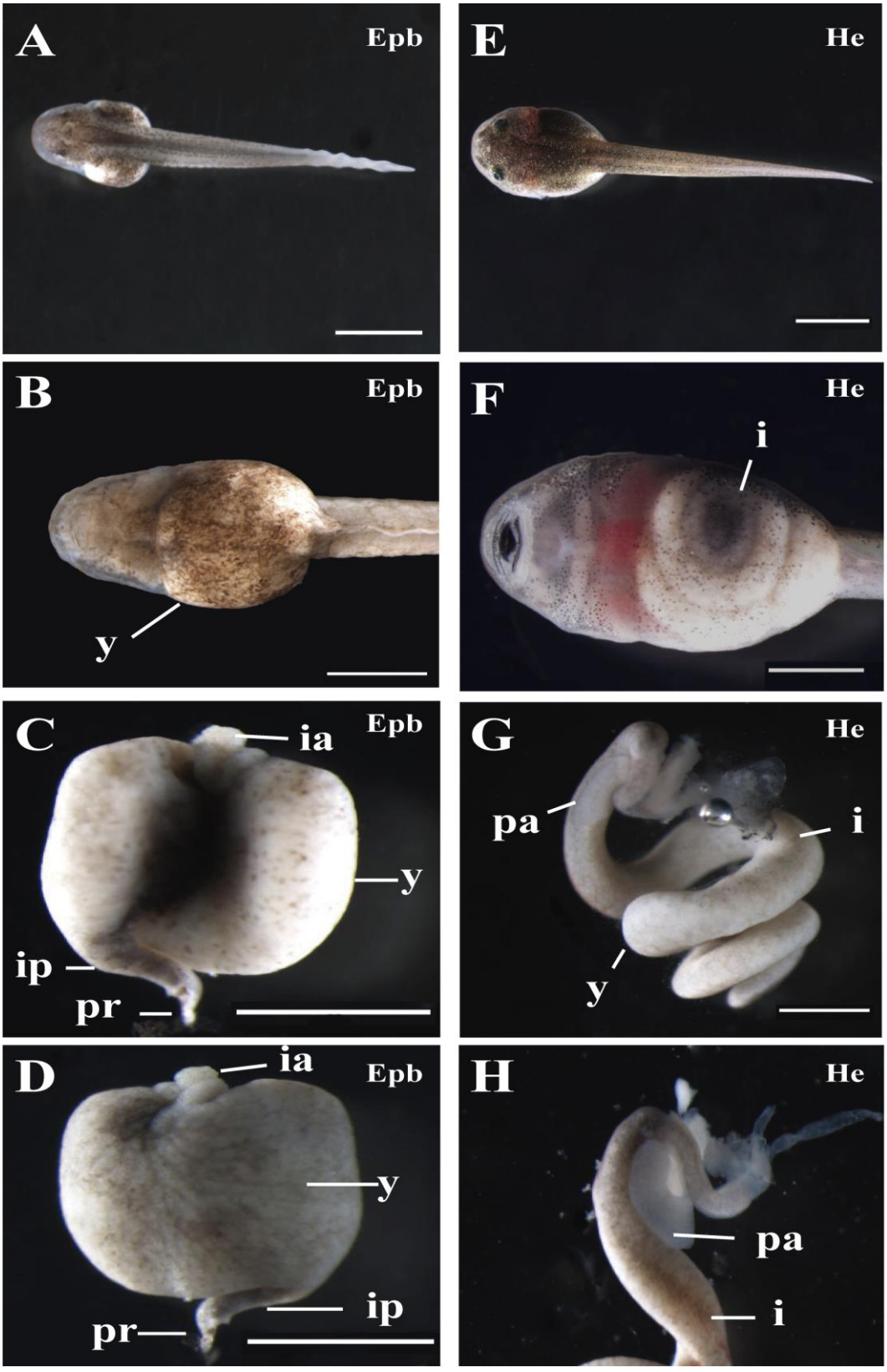

A
Epb
E
He
B
Epb
y
F
He
i
C
Epb
ia
y
ip
pr
G
He
pa
i
y
D
Epb
ia
y
ip
pr
H
He
pa
i

Figura 1. Intestino de *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus* en estadio 25. (A-D) *Espadarana prosoblepon.* (A) Vista dorsal de un individuo completo al momento de la eclosión (B) Vista ventral de individuo completo en A, se observa una gran cantidad de yema. (C) Vista dorsal del intestino, en parte anterior se ve una porción pequeña del intestino, parte posterior del intestino esta diferenciada, con poca cantidad de yema. (D) Vista ventral del intestino, la masa de yema está vascularizada. Parte posterior del intestino con poca cantidad de yema. (E-H) *Hyloxalus elachyhistus.* (E) Vista dorsal de un individuo completo (F) Vista ventral del individuo antes de la disección, se observa el intestino enrollado. (G) Intestino alargado y enrollado con remanentes de yema. (H) El páncreas está formado al momento de la eclosión. Barras de escala en A y E = 2 mm; en B, C, D, F y G =1 mm

i, intestino; ia, intestino anterior; ip, intestino posterior; y, yema; pr, proctodeo; pa, páncreas; Epb, *Espadarana prosoblepon;* He, *Hyloxalus elachyhistus.*

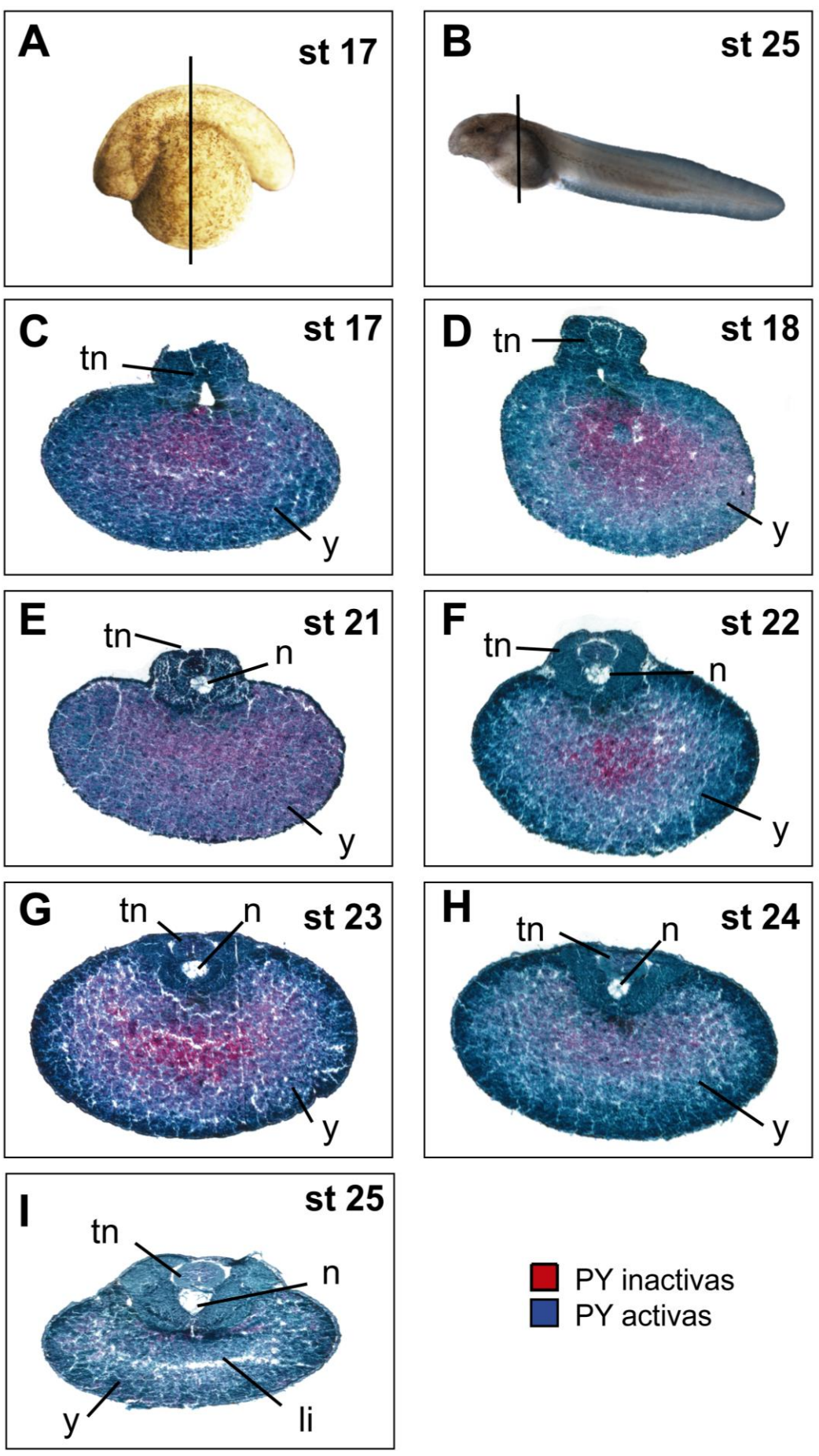

A
st 17
B
st 25
C
st 17
tn
y
D
tn
st 18
y
E
tn
n
st 21
y
F
tn
n
st 22
y
G
tn
n
st 23
y
H
tn
n
st 24
y
I
st 25
tn
n
y
li
PY inactivas
PY activas

Figura 2. Secuencia de secciones transversales con tinción safranina y fast green durante la embriogénesis tardía de *Espadarana prosoblepon.* (A-B) Individuos enteros como referencia del primer y último estadio utilizados para la tinción. La línea indica la región donde se realizan los cortes histológicos. (A) Individuo entero en estadio 17. (B) Individuo entero en estadio 25. (C) Corte transversal en estadio 17. (D) Corte transversal en estadio 18. (E) Corte transversal en estadio 21. (F) Corte transversal estadio 22, las células de la periferia del endodermo están diferenciadas. (G) Corte transversal en estadio 23. (H) Corte transversal en estadio 24. (I) Corte transversal en estadio 25. El lumen intestinal está formado. Regiones rojas indican presencia de PY inactivas y las regiones de azul indican la presencia de PY activas.

li, lumen intestinal; n, notocordio; y, yema; py, plaquetas de yema; tn, tubo neural;

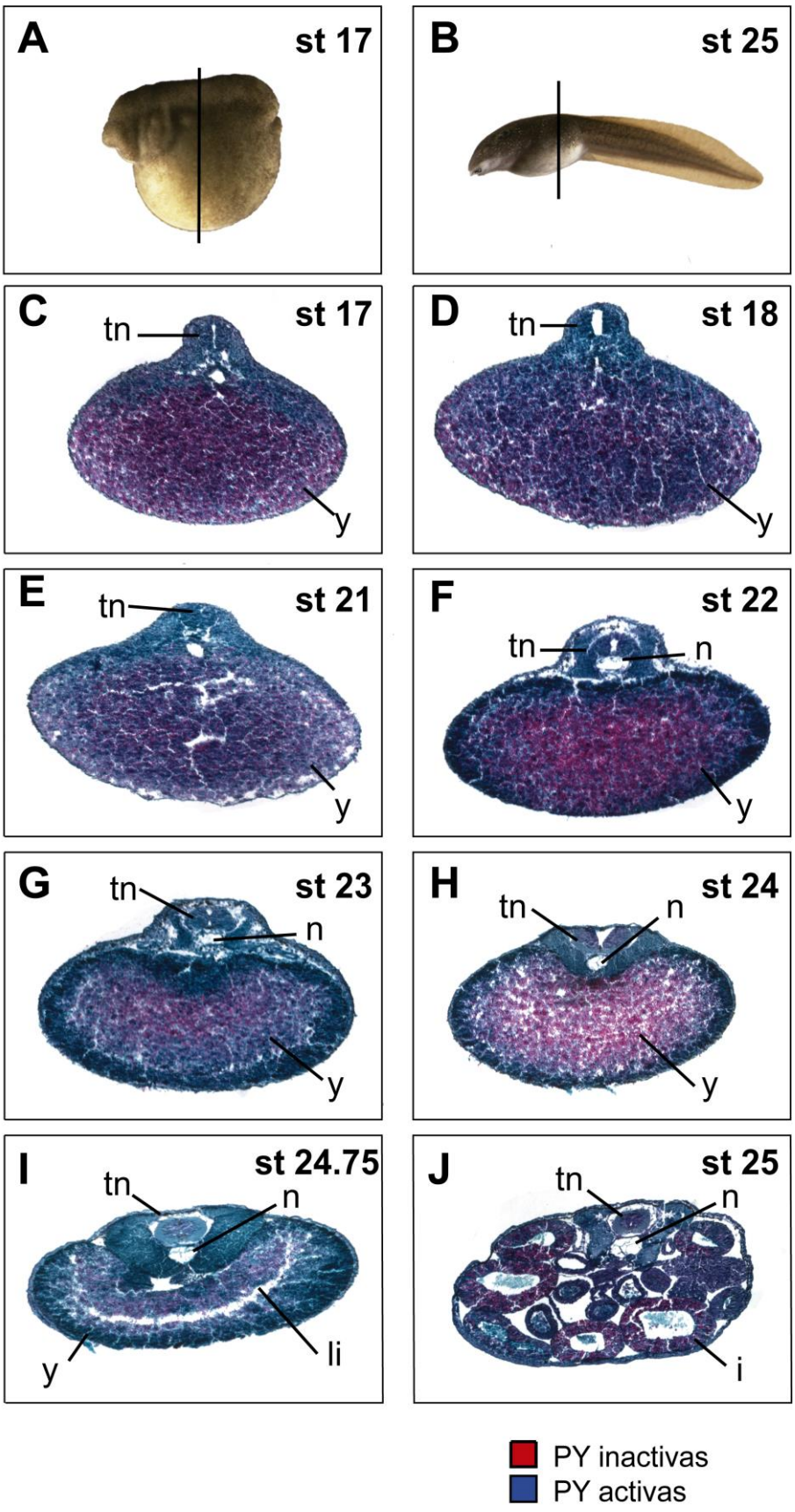

A
st 17
B
st 25
C
st 17
tn
y
D
st 18
tn
y
E
st 21
tn
y
F
st 22
tn
n
y
G
st 23
tn
n
y
H
st 24
tn
n
y
I
st 24.75
tn
n
y
li
J
st 25
tn
n
i
PY inactivas
PY activas

Figura 3. Secuencia de secciones transversales con tinción safranina y fast green durante la embriogénesis tardía de *Hyloxalus elachyhistus.* (A-B) Individuos enteros, referencia del primer y último estadio utilizados para la tinción. La línea indica la región donde se realizan los cortes histológicos. (A) Individuo entero en estadio 17. (B) Individuo entero en estadio 25. (C) Corte transversal en estadio 17. (D) Corte transversal en estadio 18. (E) Corte transversal en estadio 21. (F) Corte transversal estadio 22, las células de la periferia del endodermo están diferenciadas. (G) Corte transversal en estadio 23. (H) Corte transversal en estadio 24. (I) Corte transversal en estadio 24.75. El lumen intestinal está formado. J) Corte transversal en estadio 25. El endodermo esta diferenciado, el intestino tiene remanentes de yema. Regiones rojas indican presencia de PY inactivas y las regiones de azul indican la presencia de PY activas.

i, intestino; li, lumen intestinal; n, notocordio; y, yema; py, plaquetas de yema; tn, tubo neural;

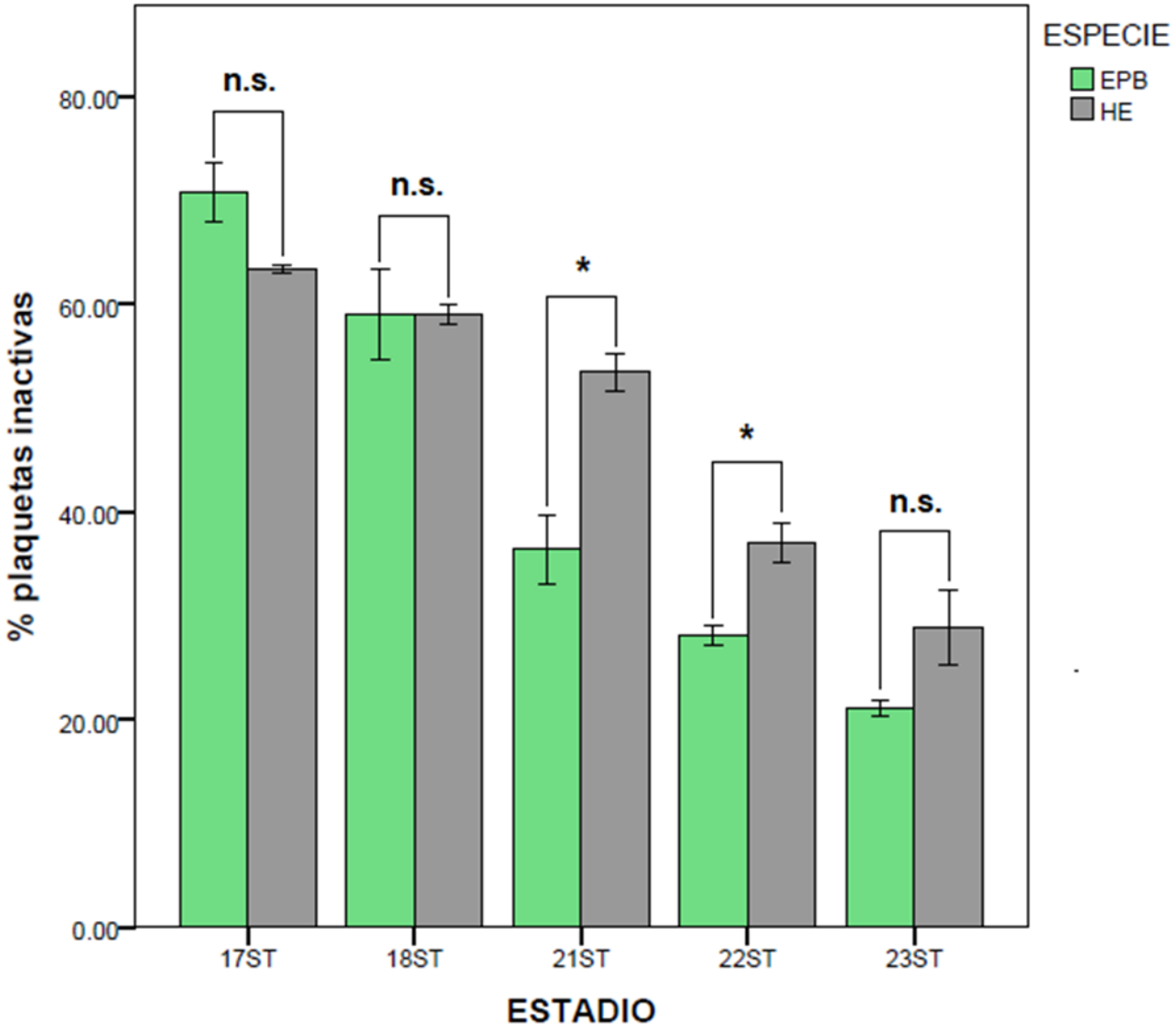


Figura 4. Comparación del porcentaje de plaquetas de yema inactivas presentes en estadios de embriogénesis tardía en *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus.* El eje x representa los estadios en los que se realizaron las cuantificaciones. El eje y representa el porcentaje de plaquetas de yema inactivas. Las leyendas en la parte superior derecha indican el color que representa a cada especie en el gráfico. El porcentaje de plaquetas de yema disminuye en todos los estadios en ambas especies. En los estadios 21 y 22 hay diferencias significativas con un valor $p \leq 0.05$. Para el valor p de 0.01 no hay diferencias entre ningún estadio. Las barras negras representan el error típico.

*, significancia $p \leq 0.05$; n.s. no hay significancia $p \geq 0.05$; EPB, *Espadarana prosoblepon;* HE, *Hyloxalus elachyhistus.*

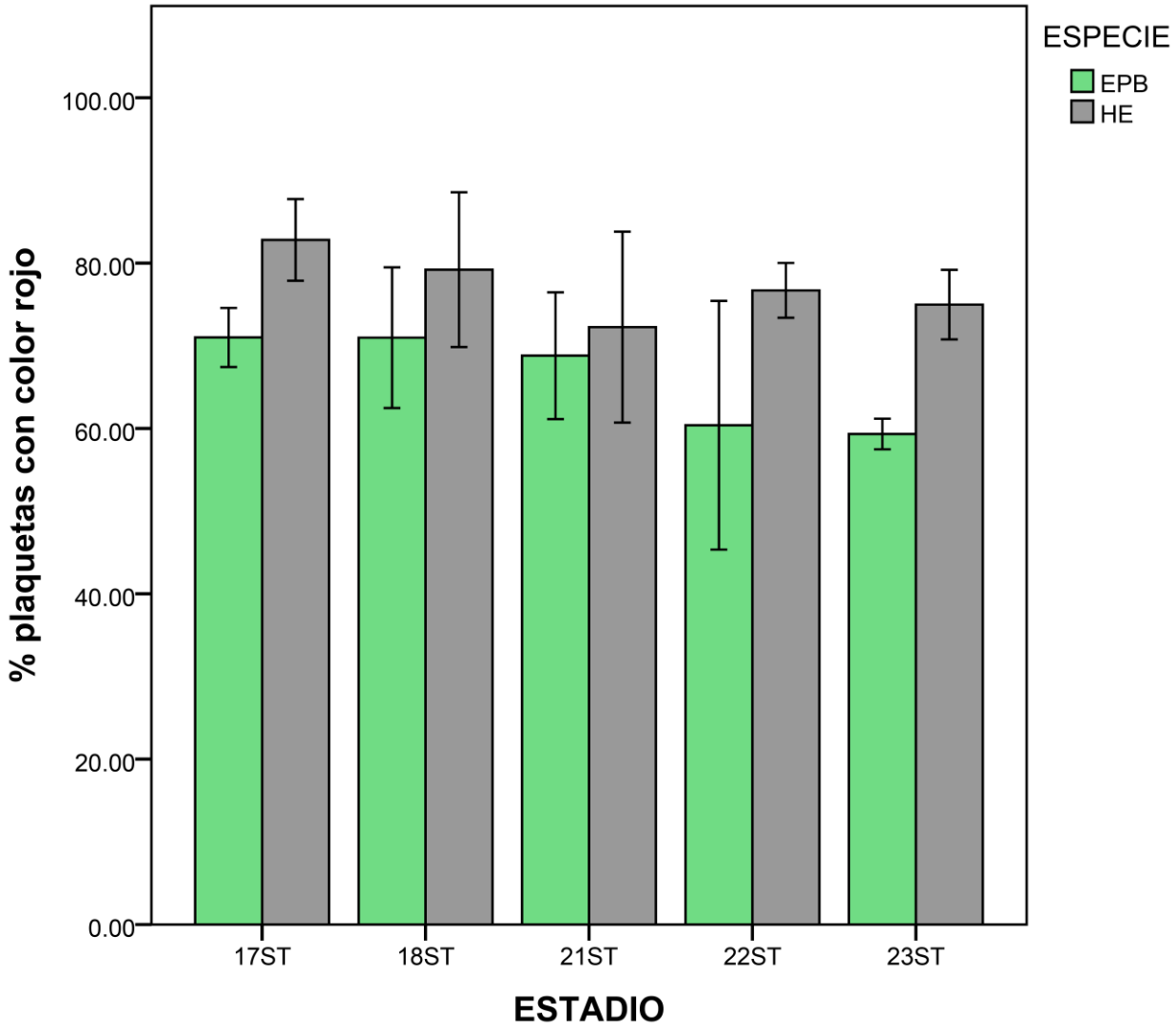


Figura 5. Comparación del porcentaje de plaquetas de yema con tinción de color rojo en estadios de embriogénesis tardía en *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus.* El eje x representa los estadios en los que se realizaron las cuantificaciones. El eje y representa el porcentaje de plaquetas de yema con color rojo. En todos los estadios de *Espadarana prosoblepon* hay menos plaquetas con tinción roja que en *Hyloxalus elachyhistus* Las leyendas en la parte superior derecha indican el color que representa a cada especie en el gráfico. Las barras negras representan el error típico.

EPB, *Espadarana prosoblepon;* HE, *Hyloxalus elachyhistus.*

11. TABLAS

Tabla 1. Promedio de plaquetas de yema inactivas en estadios de embriogénesis tardía en *Espadarana prosoblepon*.

	% de plaquetas inactivas				
Individuos	**17st**	**18st**	**21st**	**22st**	**23st**
1	76.59	67.62	35.13	29.6	19.8
2	67.57	54.75	42.75	26.19	22.39
3	68.33	54.75	31.33	28.63	21.22
Promedio	**70.83**	**59.04**	**36.40**	**28.14**	**21.14**
Desviación estándar	**5.00276**	**7.43050**	**5.81521**	**1.75701**	**1.29701**
Error típico	**2.88834**	**4.29000**	**3.35742**	**1.01441**	**0.74883**

Tabla 2. Promedio de plaquetas de yema inactivas en estadios de embriogénesis tardía en *Hyloxalus elachyhistus.*

	% de plaquetas inactivas				
Individuos	**17st**	**18st**	**21st**	**22st**	**23st**
1	62.67	57.11	51.11	33.55	26.82
2	64.23	59.44	52.21	37.8	35.82
3	63.33	60.42	57.12	39.75	23.93
Promedio	**63.41**	**58.99**	**53.48**	**37.03**	**28.86**
Desviación estándar	**0.78307**	**1.70026**	**3.19995**	**3.17030**	**6.20113**
Error típico	**0.45211**	**0.98165**	**1.84749**	**1.83038**	**3.58023**

12. ANEXOS

Anexo 1. Individuos de *Espadarana prosoblepon* utilizados para las disecciones.

Individuo	Postura	#Terrario
1	Epb 024[1]	4006
2	Epb 024	4006
3	Epb 024	4006
4	Epb 024	4006
5	Epb 026	4162
6	Epb 026	4162
7	Epb 026	4162
8	Epb 026	4162
9	Epb 027	3559
10	Epb 027	3559
11	Epb 027	3559
12	Epb 027	3559

1 Epb y un número de 3 cifras representa la codificación de la postura Epb-024 = Postura número 24 de *Espadarana prosoblepon*.

Anexo 2. Individuos de *Hyloxalus elachyhistus* utilizados para las disecciones.

Individuo	Postura	#Terrario
1	He 073	4706
2	He 073	4706
3	He 073	4706
4	He 073	4706
5	He 065	4636
6	He 055	4705
7	He 071	4529
8	He 071	4529
9	He 071	4529
10	He 071	4529

1 He y un número de 3 cifras representa la codificación de la postura He073= Postura número 73 de *Hyloxalus elachyhistus*.

Anexo 3. Lista de embriones de *Espadarana prosoblepon* utilizados para realizar la tinción safranina y fast green.

Código	Codificación de la Postura	Estadio	#Terrario
1A17[1]	Epb-031[2]	17	4162
2A17	Epb-026	17	4006
3A17	Epb-026	17	4006
1A18	Epb-029	18	3554
2A18	Epb-029	18	3554
3A18	Epb-029	18	3554
1A21	Epb-025	21	4006
2A21	Epb-025	21	4006
3A21	Epb-032	21	4006
1A22	Epb-035	22	4162
2A22	Epb-035	22	4162
3A22	Epb-035	22	4162
1A23	Epb-035	23	4162
2A23	Epb-035	23	4162
3A23	Epb-031	23	4162
1A24	Epb-027	24	3559
2A24	Epb-027	24	3559
3A24	Epb-031	24	4162
1A25	Epb-032	25	4006
2A25	Epb-032	25	4006
3A25	Epb-031	25	4162

1 Es el código personal asignado a cada individuo.

2 Epb y un número de 3 cifras representa la codificación de la postura Epb-031 = Postura número 35 de *Espadarana prosoblepon*.

Anexo 4. Lista de embriones de *Hyloxalus elachyhistus* utilizados para realizar la tinción safranina y fast green.

Código	Postura	Estadio	#Terrario
1B17	He033-03	17	4186
2B17	He033-03	17	4186
3B17	He054-90	17	4529
1B18	He041-28	18	4186
2B18	He034-13	18	4529
3B18	He034-13	18	4529
1B21	He035-08	21	4453
2B21	He035-08	21	4453
3B21	He035-08	21	4453
1B22	He035-10	22	4453
2B22	He035-10	22	4453
3B22	He038-05	22	4186
1B23	He039-25	23	4186
2B23	He039-25	23	4186
3B23	He035-12	23	4453
1B24	He036-17	24	4186
2B24	He036-17	24	4186
3B24	He036-17	24	4186
1B25	He037-22	25	4400
2B25	He037-22	25	4400
3B25	He045-62	25	4697

1 Es el código personal asignado a cada individuo.

2 He y un número de 3 cifras representa la codificación de la postura y el número de dos cifras representa el código de fijación. He033-03 = Postura número 33 y tercera fijación de *Hyloxalus elachyhistus.*

Anexo 5. Tabla de ANOVA de una vía con la comparación de plaquetas de yema inactivas entre individuos del mismo estadio de las especies *Espadarana prosoblepon* e *Hyloxalus elachyhistus.*

		Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig.
17 ST	Entre Grupos	82.585	1	82.585	6.442	0.064
	Dentro de Grupos	51.282	4	12.82		
	Total	133.866	5			
18 ST	Entre Grupos	.004	1	.004	.000	.991
	Dentro de Grupos	116.206	4	29.052		
	Total	116.210	5			
21 ST	Entre Grupos	437.419	1	437.419	19.856	.011
	Dentro de Grupos	88.120	4	22.030		
	Total	525.538	5			
22 ST	Entre Grupos	118.637	1	118.637	18.060	.013
	Dentro de Grupos	26.276	4	6.569		
	Total	144.913	5			
23 ST	Entre Grupos	89.398	1	89.398	4.455	.102
	Dentro de Grupos	80.273	4	20.068		
	Total	169.670	5			

Anexo 6. Lista de las soluciones utilizadas y su fórmula molar.

- SOLUCIÓN DE STEINBERG (Rugh, 1962)

  - 58 mM NaCl
  - 0,65 mM KCl
  - 0,85 mM MgSO4
  - 5 mM Tris, pH 8
  - 0,34 mM Ca (NO3)2
  - Agua destilada

- SOLUCIÓN SALINA TAMPÓN FOSFATO (PBS)

  - 1,5 mM KH2PO4
  - 7 mM Na2HPO4
  - 137,7 mM NaCl

- 4% FORMALDEHIDO (10% FORMALINA)

  - 37% Formaldehido
  - Agua destilada

- FIJATIVO SMITH

SOLUCIÓN A

- 35 mM dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

SOLUCIÓN B

- 20% Formaldehído (Formalina)
- 5% ácido acético
- Agua destilada

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Henry Fabián Macías Bazante**,** con C.I. 1722148952, autor del trabajo de graduación titulado: "Estudio del patrón de consumo de plaquetas de yema del endodermo en *Espadarana prosoblepon* (Centrolenidae) e *Hyloxalus elachyhistus* (Dendrobatidae)" previa la obtención del grado académico de LICENCIADO 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, 20 de marzo del 2019

Henry Fabián Macías Bazante

1722148952