

1. RESUMEN

En el presente estudio se describe la estructura de los embriones desde la néurula hasta la eclosión del renacuajo, de dos especies de ranas de la familia Dendrobatidae: *Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates auratus*. Estas especies difieren en su tamaño de huevo. Además, se analiza la morfología de los somitas y la expresión de proteínas musculares de las miofibrillas, mediante la inmunodetección con el anticuerpo muscular 12/101. El análisis fue realizado dentro de un marco comparativo con respecto a *Epipedobates machalilla* y *Xenopus laevis*. En las dos especies estudiadas, el notocordio es identificado a partir de la néurula temprana. El proceso de neurulación en *H. vertebralis* y *D. auratus* presenta un patrón similar al descrito para *X. laevis* y *E. machalilla*.

La estructura interna de los embriones de *H. vertebralis* y *D. auratus* coincide con los eventos descritos para *X. laevis*. Sin embargo, se encontraron diferencias en el tiempo en el que estos eventos suceden. En las ranas dendrobátidas muchos de los tejidos se diferencian en estadios más avanzados, con respecto a *X. laevis*.

El patrón de somitogénesis en *H. vertebralis* y *D. auratus* coincide con el patrón de interdigitación celular descrito para *Bombina variegata* y *E. machalilla*. La expresión de proteínas musculares fue detectada a partir del estadio de yema de la cola en *H. vertebralis* y *D. auratus*. Al igual que en *E. machalilla*, las especies estudiadas, presentan un retraso en la expresión muscular en contraste con *X. laevis*. Por otro lado, no se detectó la expresión del antígeno de 12/101 en los somitas caudales. Estos resultados sugieren que la especificación del linaje muscular puede estar retrasada en las ranas dendrobátidas.

En este trabajo se encontraron algunas diferencias tanto en la estructura como en la somitogénesis de los embriones de las ranas dendrobátidas, en comparación con *X. laevis*. Estas diferencias pueden ser explicadas por la variación en la estrategia reproductiva y el modo de vida de las especies estudiadas.

Palabras clave: *Dendrobates auratus*, *Epipedobates machalilla*, *Hyloxalus vertebralis*, mesodermo presomítico, miogénesis, neurulación, somitogénesis, *Xenopus laevis*.

2. ABSTRACT

This work describes the structure of the embryos of two frog species that belong into the family Dendrobatidae: *Hyloxalus vertebralis* and *Dendrobates auratus*. These species have different egg size. This work analyzes the somite morphology and the protein expression of muscle myofibrils, in both species. In order to analyze the protein expression, the embryos were immunostained with the muscle-specific antibody 12/101. In this study, the results were compared with the patterns described for *Epipedobates machalilla* and *Xenopus laevis*. In the two studied species, the notochord was first identified during the early neurula. In *H. vertebralis* and *D. auratus*, neurulation corresponds to the pattern described for *X. laevis* and *E. machalilla*.

The internal structure of *H. vertebralis* and *D. auratus* embryos corresponds to the events described for *X. laevis*. However, differences were found in the time when events occurred. Compared with *X. laevis*, in dendrobatid frogs many tissues start to differentiate at more advanced stages.

In *H. vertebralis* and *D. auratus*, somitogenesis corresponds to a pattern called somitogenesis by cellular interdigitation. This pattern was described for *Bombina variegata* and *E. machalilla*. The expression of the muscular proteins was detected since the tail bud stage, in *H. vertebralis* and *D. auratus*. Like *E. machalilla*, both species showed a delay in the expression of muscular proteins, when they were compared with *X. laevis*. The expression of the antigen of 12/101 was not detected on the most caudal somites. These results suggest that the muscle lineage specification may be delayed in dendrobatid frogs.

Differences in the structure and somitogenesis were detected in dendrobatid frogs, when compared with *X. laevis*. These differences may be explained by the variation in reproductive strategy and lifestyle of the species analyzed.

Key words: *Dendrobates auratus*, *Epipedobates machalilla*, *Hyloxalus vertebralis*, myogenesis, neurulation, presomitic mesoderm, somitogenesis, *Xenopus laevis*.

3. INTRODUCCIÓN

Hyloxalus vertebralis es una rana ecuatoriana endémica, que se encuentra en peligro crítico de extinción (Coloma *et al.*, 2004). Esta especie habita en los bosques nublados de los valles inter-Andinos, y en las pendientes occidentales de los Andes del sur del Ecuador (Coloma *et al.*, 2004). Por otro lado, *Dendrobates auratus* se distribuye en los bosques húmedos de Centroamérica hasta la parte norte de Suramérica. Su distribución no incluye al Ecuador (Solís *et al.*, 2004). Las dos especies depositan sus huevos en nidos terrestres sobre la hojarasca. Los embriones reciben cuidado parental por parte del macho, y en el momento de la eclosión éste los lleva en su espalda hacia una fuente de agua, donde se desarrollarán hasta alcanzar la metamorfosis (Coloma *et al.*, 2004; Solís *et al.*, 2004). *Dendrobates auratus* tiene huevos grandes, de 3.5 mm de diámetro; y presenta desarrollo temprano lento (del Pino *et al.*, 2007). El diámetro del huevo de *H. vertebralis* es de aproximadamente 2.5 mm y su velocidad de desarrollo se asemeja a la de otros dendrobátidos, de acuerdo a trabajos en progreso.

La morfología del desarrollo de *H. vertebralis* desde el clivaje hasta la gastrulación es analizada en el laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE. Para profundizar y complementar el conocimiento sobre el desarrollo temprano de *H. vertebralis*, se escogió la morfología y somitogénesis de los embriones, como las temáticas del presente estudio. Una dificultad para este trabajo es la escasa disponibilidad del material biológico de *H. vertebralis*. Por esta razón se amplió el estudio a una segunda especie. Se escogió *D. auratus*, porque es el dendrobátido estudiado que tiene los huevos más grandes, y porque el desarrollo en esta rana es relativamente lento en comparación con dendrobátidos de huevos más pequeños (del Pino *et al.*, 2007).

Los mecanismos del desarrollo temprano de los vertebrados son altamente

conservados, incluyendo la neurulación y somitogénesis (Pourquié, 2003). Pero se han encontrado diferencias en estos procesos, al comparar especies cercanamente relacionadas (Pourquié, 2001). Incluso dentro de los anfibios existen diferencias fundamentales en el desarrollo temprano (Elison y del Pino, 2011). Lo que ha llevado sugerir que la historia evolutiva de cada especie puede haber determinado una divergencia en los procesos del desarrollo de los anfibios (Radice *et al.*, 1989). Esta divergencia puede ser el resultado de la larga historia filogenética de los anfibios, o de las adaptaciones sufridas por los embriones para poder desarrollarse en diferentes ambientes (Elison y del Pino, 2011). Por lo tanto el estudio del desarrollo temprano puede proporcionar importantes datos para entender las relaciones evolutivas de las especies (Smetanick *et al.*, 1999).

En los vertebrados el desarrollo del sistema nervioso está determinado por la formación del tubo neural. El tubo neural se forma durante la neurulación (Harrington *et al.*, 2009). Los primeros indicios de la neurulación corresponden a la formación de los pliegues neurales en los bordes de la placa neural. La placa neural es la región del ectodermo que se encuentra por encima del notocordio. Durante la neurulación, los pliegues neurales se elevan, se juntan en la línea media y se fusionan para formar el tubo neural. El tubo neural se diferenciará en las partes del cerebro y cordón espinal en estadios más avanzados del desarrollo. Las células de los pliegues neurales no se incorporan ni al ectodermo de piel ni al tubo neural y dan origen a la cresta neural. Al cerrarse el tubo neural, estas células, denominadas cresta neural, se separan como mesénquima y migran por diferentes rutas. Las células de la cresta neural dan origen al sistema nervioso periférico, a células de pigmento, huesos del cráneo y del rostro, y otras estructuras. Durante estos procesos el embrión se encuentra en estadio de néurula. (Wolpert *et al.*, 2007; Anexo 1).

En *Xenopus laevis*, la placa neural es visible en el estadio 13. Los pliegues neurales se elevan en la néurula temprana, en el estadio 14. La néurula media, estadio 16, se caracteriza por el acercamiento de los pliegues neurales. El cerramiento del tubo neural ocurre en la néurula tardía en el estadio 20 de Nieuwkoop y Faber (1994) (Anexo 2). El desarrollo de *Epipedobates machalilla* está homologado al de *X. laevis* hasta el estadio 14. La néurula media, se reconoce en el estadio 15, y el tubo neural se cierra en el estadio 16, en la néurula tardía, de acuerdo a los estadios del desarrollo de esta especie (del Pino *et al.*, 2004).

La formación del tubo neural requiere cambios en la forma celular y migración celular (Greene y Copp, 2009). Durante la gastrulación, las células que formarán la placa neural se alargan y estrechan. Estas células mantienen la forma alargada hasta el inicio de la neurulación. La neurulación inicia cuando los extremos de la placa neural se elevan. Las células de los extremos de la placa neural cambian de forma durante este proceso. Estas células se contraen hasta adquirir una forma triangular como de una cuña. Este cambio en la forma celular determina el establecimiento de los pliegues neurales. (Colas y Schoenwolf, 2001). A continuación los pliegues neurales se fusionan en la línea media para formar el tubo neural. La formación del tubo neural requiere de un complejo patrón de movimientos celulares, que involucra migración celular (Colas y Schoenwolf, 2001; Greene y Copp, 2009).

Cuando se ha formado el tubo neural, éste se separa del ectodermo que formará la epidermis. La separación del tubo neural involucra cambios en las fuerzas de adhesión celular. Inicialmente las células de la placa neural expresan la molécula de adhesión L-CAM. Sin embargo, cuando los pliegues neurales se levantan, las células ectodermales del tubo neural expresan las moléculas de adhesión N-CAM y N-cadherinas. Mientras que el ectodermo que formará la epidermis solo expresa E-cadherinas. Este cambio en la

expresión de moléculas de adhesión determina la separación del tubo neural y del ectodermo superficial (Colas y Schoenwolf, 2001; Wolpert *et al.*, 2007).

El proceso de neurulación en los vertebrados requiere de señales inductoras que se establecen tempranamente durante la gastrulación (Shin *et al.*, 2005). En los anfibios el organizador de Spemann es responsable de la inducción del tejido neural y del establecimiento de eje antero-posterior. Existen varias proteínas, expresadas por el organizador, que han sido relacionadas con la inducción neural. El organizador expresa proteínas que son responsables de la inhibición de las vías de señalización BMP y Wnt. Durante la gastrulación, las vías BMP y Wnt inducen a las células ectodermales para formar epidermis, a la vez que inhiben el destino neural (Yan *et al.*, 2010). El organizador de Spemann activa proteínas antagonistas a las vías BMP y Wnt como Chordin, Noggin, Follistatin, Dickkopf y Cerberus (Shin *et al.*, 2005). La inhibición de las vías BMP y Wnt permite que las células ectodermales adopten un destino neural. Existe una tercera vía de señalización involucrada en la inducción neural, la vía FGF. A diferencia de BMP y Wnt, la señalización de FGF promueve la formación de tejido neural (Yan *et al.*, 2010).

La somitogénesis es el desarrollo de los somitas a partir del mesodermo paraxial. El mesodermo paraxial se encuentra a cada lado de la línea media del cuerpo. Luego de la gastrulación, el mesodermo paraxial puede subdividirse en dos regiones a lo largo del eje antero-posterior: el mesodermo cefálico y el mesodermo somítico. El mesodermo cefálico se identifica desde el tope anterior hasta la zona de las vesículas óticas del embrión; y dará origen a varias estructuras de la cabeza, pero no forma somitas. El mesodermo somítico o presomítico se segmenta en los somitas (Mallo *et al.*, 2009; Pourquié, 2003). En *Xenopus laevis*, el mesodermo paraxial se origina de las capas profundas de las dos regiones marginales localizadas a cada lado del organizador de Spemann (Pourquié, 2001). El establecimiento del mesodermo paraxial es el resultado de los movimientos

morfogenéticos que ocurren en la gastrulación. En la gastrulación de los embriones de *Xenopus laevis*, el mesodermo involucre por el labio del blastoporo. La involucre del mesodermo determina que el mesodermo paraxial prospectivo se ubique bajo el ectodermo. Después de la involucre, el mesodermo paraxial prospectivo converge a través del blastoporo y subsecuentemente se elonga a lo largo del eje antero-posterior, para formar el mesodermo presomítico (Pourquié, 2001; Standley *et al.*, 2002). El mesodermo presomítico (PSM, por sus siglas en inglés) empezará a segmentarse en los somitas (Afonin *et al.*, 2006; Fomenou *et al.*, 2005; Pourquié, 2001)

La organización metamérica del mesodermo paraxial en los somitas, representa la primera segmentación del embrión durante el desarrollo (Fomenou *et al.*, 2005). Los somitas se generan en sentido rostro-caudal por segmentación del mesodermo paraxial y son bloques de células que se generan de manera secuencial y sincrónica (Radice *et al.*, 1989; Takahashi, 2005). La somitogénesis empieza en la zona rostral y recorre el eje antero-posterior hasta el extremo caudal del embrión. Este proceso ocurre a los lados del tubo neural y del notocordio (Krneta-Stankic *et al.*, 2010). De los somitas se originará una variedad de tejidos como son los huesos y cartílagos del tronco, el músculo esquelético, y la dermis (Krneta-Stankic *et al.*, 2010; Mallo *et al.*, 2009; Radice *et al.*, 1989; Wolpert *et al.*, 2007).

El número total de somitas es específico para cada especie pero varía dramáticamente entre especies (Pourquié, 2003). La velocidad de la somitogénesis, también es específica para cada especie a una temperatura determinada (Afonin *et al.*, 2006; Kondow *et al.*, 2006; Pourquié, 2003). En el pez cebra se forman un par de somitas cada 20 minutos; en el pollo cada 90 minutos (Pourquié, 2003; Takahashi, 2005); y en *X. laevis* cada 45 minutos (Wolpert *et al.*, 2007).

Una vez que los somitas se han desarrollado, empieza el proceso de diferenciación

de cada somita (Mallo *et al.*, 2009). Inicialmente los somitas se diferencian en esclerotoma y dermomiótoma, ubicados en la zona ventral y en la zona dorsal del somita, respectivamente (Mallo *et al.*, 2009). Posteriormente el dermomiótoma se reorienta, diferenciándose en miótoma y dermatoma (Kielbówna, 1981; Anexo 3). El esclerotoma dará origen a células mesenquimales, que se diferenciarán en células de las vértebras y las costillas; el dermatoma dará origen al tejido conectivo de la dermis; y el miótoma, que ocupa la mayor parte del somita, dará origen a los músculos. El miótoma contiene a los mioblastos que son las células formadoras de músculo (Radice *et al.*, 1989; Wolpert *et al.*, 2007). La miogénesis es el proceso de diferenciación de los mioblastos. Las células que componen el miótoma se diferencian en miotúbulos multinucleados, los cuales formarán las fibras musculares (Radice *et al.*, 1989).

La diferenciación del miótoma es el resultado de la acción de señales que provienen del ectodermo. Este proceso es controlado por señales ventralizantes y dorsalizantes; que provienen de tejidos que rodean el somita. Las señales ventralizantes provienen del notocordio y del tubo neural e incluyen: Sonic hedgehog (Shh) y Noggin. Las señales dorsalizantes son mediadas por la vía de señalización Wnt (Christ y Brand-Saberi, 2002). Además varios estudios sugieren que las integrinas (proteínas transmembrana) cumplen un papel importante para la correcta segmentación del somita y la diferenciación del miótoma, tanto en *X. laevis* como en otros vertebrados (Krneta-Stankic *et al.*, 2010).

Se han descrito los patrones de somitogénesis de numerosas especies de vertebrados. En el embrión de pollo, inicialmente cada somita se forma a partir de un agrupamiento de células organizadas en forma de roseta. Subsecuentemente la mayoría de las células del somita, que son mononucleadas, se elongan y se fusionan para formar fibras musculares multinucleadas (Youn y Malacinski, 1981). La rana, modelo del

desarrollo embrionario, *Xenopus laevis* utiliza otro modo de miogénesis, denominado por rotación celular (Radice *et al.*, 1989). En *X. laevis*, antes de la segmentación, el mesodermo presomítico está formado por dos capas de células separadas por una cavidad llamada miocele (Hamilton, 1969; Kielbówna, 1981). Durante la somitogénesis, las células del somita se arreglan en forma de roseta, al igual que en el pollo. Pero los mioblastos del mesodermo presomítico tienen una orientación perpendicular al tubo neural y durante la somitogénesis cambian su orientación. Los mioblastos giran y toman una orientación diagonal con respecto al tubo neural en el somita recién separado del mesodermo presomítico. Subsiguientemente, los mioblastos rotan 90 grados hasta alcanzar una orientación paralela al tubo neural. La longitud de cada mioblasto alcanza la longitud del miotoma del somita (Hamilton, 1969; Youn y Malacinski, 1981; Anexo 5).

Otras especies analizadas, presentan patrones similares a *X. laevis* pero con algunas diferencias en el proceso. La rana africana *Hymenochirus boettgeri*, perteneciente a la misma familia que *X. laevis* (Pipidae), presenta el mismo patrón de miogénesis que *X. laevis*. Sin embargo la secuencia de los eventos miogénéticos en *H. boettgeri* está retrasada en comparación a *X. laevis*. Pero ambos pípidos presentan un modo de miogénesis más rápido en comparación con otras especies de anuros (Smetanick *et al.*, 1999). El patrón de miogénesis de *Rana sphenoccephala*, incluye movimientos similares a *X. laevis*. Sin embargo la rotación de los mioblastos es de 45 grados; y las células mesodermales no presentan miocele ni se arreglan en forma de roseta (Youn y Malacinski, 1981).

Otros modelos de miogénesis han sido descritos para numerosas especies de anfibios. El modo de miogénesis de *Bombina variegata*, *Engystomops coloradorum*, *Engystomops randi*, *Epipedobates anthonyi*; *Epipedobates machalilla*, *Epipedobates tricolor*; y *Gastrotheca riobambae* incluye numerosos mioblastos, que son pequeños y

redondeados (del Pino *et al.*, 2004; del Pino *et al.*, 2007; Gatherer y del Pino, 1992; Kielbówna, 1981). En estas especies, el mesodermo presomítico está formado por un grupo de células sin arreglo específico y sin miocele. En el estadio de yema de la cola los mioblastos se alargan e interdigitan, hasta quedar paralelos al notocordio. Los mioblastos se alargan hasta alcanzar la longitud del somita (del Pino *et al.*, 2007; Gatherer y del Pino, 1992; Kielbówna, 1981; Radice *et al.*, 1989) . Este modo se denomina miogénesis por interdigitación celular (Anexo 5). Un modo de miogénesis similar se ha descrito para *Bufo bufo*, *Pelobates fuscus*, y *Rana dalmatina* (Brustis, 1979; Kielbówna, 198; Radice *et al.*, 1989). En estas especies las células del mesodermo presomítico tampoco presentan un arreglo específico ni miocele, como ocurre en *X. laevis*. Pero a diferencia de las especies anteriores, la somitogénesis ocurre por fusión celular. Las células de los somitas se fusionan y forman mioblastos multinucleados en etapas tempranas de la miogénesis (Radice *et al.*, 1989). Otros modos de miogénesis se han descrito para otras especies de anuros y urodelos. (Radice *et al.*, 1989; Youn y Malacinski, 1981; Anexo 5).

Los resultados en las especies estudiadas han concluido que existen varios patrones de somitogénesis y miogénesis dentro de los vertebrados, e incluso dentro de los anfibios. La estructura final de los miotúbulos multinucleados que formarán la fibra muscular es similar en todas las especies estudiadas. Sin embargo, las vías para alcanzar este estadio de diferenciación varían entre las especies de anfibios (Pourquié, 2003; Radice *et al.*, 1989). Esta observación ha llevado a abandonar la idea de que existe un programa único y universal de miogénesis. Es posible que el proceso miogénético haya sido modificado durante la evolución de las especies (Radice *et al.*, 1989).

Las diferencias en el patrón de somitogénesis podrían estar ligadas a las diversas estrategias reproductivas que presentan los anfibios. Sin embargo se ha sugerido que el patrón de miogénesis no está asociado al tamaño del huevo ni al modo de reproducción

(del Pino *et al.*, 2007). Pero es posible que exista una relación directa entre la velocidad del desarrollo y el modo de miogénesis de los anfibios. Según esta hipótesis los anfibios con desarrollo rápido pueden compartir aspectos miogénéticos que difieren de la miogénesis de los anfibios con desarrollo lento (Radice *et al.*, 1989). Para aclarar este tema sería interesante estudiar la somitogénesis en anfibios con tasas de desarrollo extremas (Gatherer y del Pino, 1992). Es probable que los diferentes patrones de miogénesis provean diferentes ventajas funcionales a cada especie o representan historias naturales específicas de cada linaje (Fan *et al.*, 2001). Por eso el estudio comparativo de la somitogénesis dentro de los linajes puede proporcionar información filogenética invaluable (Smetanick *et al.*, 2000).

La variedad de patrones de somitogénesis, a nivel morfológico, puede reflejar una variación en las vías moleculares de este proceso (Gatherer y del Pino, 1992). Sin embargo, muchos autores mantienen que los mecanismos moleculares, responsables del patronamiento de los somitas, son conservados dentro de los vertebrados (Krneta-Stankic *et al.*, 2010; Pourquié, 2003). Se han identificado varios genes y moléculas de señalización que intervienen en la somitogénesis. Tanto genes como moléculas de señalización, están involucrados en varios procesos de la somitogénesis: maduración y compartimentación de los somitas; delaminación de las células precursoras de músculo; y control de la migración, proliferación y diferenciación muscular (Christ y Brand-Saberi, 2002).

Los genes más conocidos como reguladores de la identidad segmental, en los animales, son aquellos pertenecientes a la familia de los genes Hox (Mallo *et al.*, 2009). Los genes Hox especifican la identidad posicional a lo largo del eje antero-posterior, por lo que otorgan el valor posicional de los somitas (Fomenou *et al.*, 2005; Wolpert *et al.*, 2007). La formación secuencial y sincrónica de los somitas corresponde a la expresión

secuencial y sincrónica de los genes Hox. Existe una colinearidad entre el orden de los genes Hox en el cromosoma y su orden de expresión espacial y temporal a lo largo del eje antero-posterior (Wolpert *et al.*, 2007).

Varios estudios en el embrión de pollo, ratón y de la rana *X. laevis* han determinado que el patronamiento del mesodermo paraxial es controlado por una expresión colineal de genes Hox. Esta expresión es específica y ocurre durante la gastrulación (Fomenou *et al.*, 2005; Krneta-Stankic *et al.*, 2010). Sin embargo, Krneta-Stankic *et al.*, 2010, proponen que el ambiente celular influye en la identidad de los somitas, aunque los genes Hox predispongan la formación de estructuras específicas. Los genes Hox y su expresión colineal son un ejemplo de los mecanismos más conservados dentro del desarrollo temprano de los animales (Wolpert *et al.*, 2007). Los genes Hox proveen identidad posicional a los somitas pero no están involucrados en el proceso de segmentación como tal (Mallo *et al.*, 2009).

La segmentación de los somitas está determinada por un patrón molecular que especifica el tiempo de formación de cada segmento. Este patrón se establece tempranamente en el mesodermo presomítico, durante la gastrulación (Pourquié, 2003). La vía molecular de las somitogénesis consiste de un reloj interno, que involucra la expresión oscilatoria de genes (Giudicelli *et al.*, 2007; Mallo *et al.*, 2009; Pourquié, 2003). Cada ciclo de expresión es periódica, de tal manera que durante cada oscilación se forma un par de somitas (Giudicelli *et al.*, 2007). En el embrión del pollo, el gen *c-hairy 1* se expresa desde la zona posterior hasta la zona anterior del mesodermo presomítico. La expresión ocurre en un período de 90 minutos, tiempo que tarda la formación de un par de somitas. Una vez formado el primer par de somitas, la expresión de *c-hairy 1* se restringe a la zona posterior de cada somita. Subsecuentemente empieza un nuevo ciclo de expresión de *c-hairy 1* en el mesodermo presomítico, para formar un nuevo par de

somitas (Takahashi, 2005). La influencia de estas oscilaciones en la formación de los somitas aún no está totalmente esclarecida. Pero se ha sugerido que las vías de señalización Notch-Delta y Wnt están involucradas en la determinación de los límites entre los somitas (Mallo *et al.*, 2009; Takahashi, 2005; Wolpert *et al.*, 2007).

La expresión oscilatoria de genes, durante la somitogénesis, se ha reportado en varias especies de vertebrados. Se han encontrado genes homólogos a *c-hairy 1*, en embriones del ratón, pez cebra y *X. laevis*. Igualmente genes relacionados a las vías de señalización Notch-Delta y Wnt, han sido reportados para estas especies. Esta homología indica que el mecanismo de expresión oscilatoria de genes, durante la somitogénesis, es un patrón conservado en los vertebrados (Mallo *et al.*, 2009; Pourquié, 2001; Pourquié, 2003).

Otros procesos moleculares importantes para el estudio de la somitogénesis son las vías involucradas en la activación de genes musculares. Cuando los somitas se han diferenciado empieza la expresión de proteínas musculares en el miotoma (Radice *et al.*, 1989). La especificación del linaje muscular en el miotoma ocurre bajo la instrucción de los factores reguladores de la superfamilia de genes miogénéticos bHLH (basic helix loop helix). Los factores reguladores MyoD y Myf5 son expresados como respuesta temprana a la inducción mesodermal en *X. laevis* (Christ y Brand-Saberi, 2002). La expresión de MyoD y Myf5 gatilla la expresión de otras proteínas musculares como actina, miosina, desmin y proteínas de las miofibrillas (Radice *et al.*, 1989).

Existen otros factores reguladores que inducen la expresión de proteínas musculares. Se ha sugerido que la expresión de la miosina en *X. laevis*, también es controlada por los factores de crecimiento FGF (Standley *et al.*, 2002). La función reguladora de los factores MyoD y Myf5 es muy conservada dentro de los vertebrados, sin embargo existen diferencias en la expresión de las proteínas musculares entre

especies. En *X. laevis*, la expresión de miosina inicia en estadios tardíos de la gastrulación. A diferencia de *X. laevis*, la expresión de miosina en el urodelo *Ambystoma mexicanum* inicia al finalizar la segmentación de los somitas (Radice *et al.*, 1989).

Además se ha descrito el patrón de expresión de proteínas musculares durante la diferenciación de los somitas, para los dendrobátidos estudiados. Para esto se utilizó técnicas de inmunodetección, con el anticuerpo MF20 que revela la expresión de miosina (del Pino *et al.*, 2007) y el anticuerpo 12/101 (del Pino *et al.*, 2004). El anticuerpo monoclonal 12/101 reacciona contra una proteína de las miofibrillas, la cual tiene peso molecular de 102 kDa (Kintner y Brockes, 1985). En *X. laevis* el antígeno 12/101 es detectado desde el estadio 17 (Kintner y Brockes, 1985). Sin embargo Krneta-Stankic *et al.*, 2010, reportan que las células del mesodermo presomítico expresan el antígeno 12/101, antes de la diferenciación, en estadios más tempranos. En *E. machalilla*, tanto la miosina como el antígeno 12/101 son detectados en los somitas desde el estadio de la yema de la cola (del Pino *et al.*, 2007, del Pino *et al.*, 2004).

El estudio de la somitogénesis puede proveer información útil para entender la evolución de las familias de los anfibios (Takahashi, 2005). Los procesos morfológicos de la miogénesis varían entre las especies estudiadas. Sin embargo, las vías moleculares y la estructura final del miotoma parecen estar conservadas entre los vertebrados. Por eso el análisis de los eventos miogénéticos puede constituir un método efectivo para descubrir heterocronías en los vertebrados (Smetanick *et al.*, 1999). Además la segmentación de los somitas ha sido considerada como un sistema modelo para entender la formación de bordes y la comunicación celular (Takahashi, 2005).

Este estudio tiene como objetivo describir la morfología, estructura interna y el modelo de somitogénesis de los embriones de *Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates*

auratus; dentro de un marco comparativo con respecto a otros dendrobátidos y a *Xenopus laevis*. Además en este estudio se analiza el efecto del tamaño del huevo y la velocidad del desarrollo en el patrón de somitogénesis, y en la morfología interna y externa de los embriones de dos especies de dendrobátidos. Para complementar el estudio morfológico de los somitas de *H. vertebralis* y *D. auratus*, se analiza la expresión del antígeno 12/101 en los somitas. Por lo que este trabajo aporta información complementaria al estudio comparativo del desarrollo temprano de los anfibios

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MANTENIMIENTO Y REPRODUCCIÓN EN CAUTIVERIO

Se investigaron embriones de dos especies de ranas dendrobátidas: *H. vertebralis* y *D. auratus*. Los embriones fueron donados por el Laboratorio de Herpetología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Los sitios de colección de las ranas adultas se detalla a continuación: los individuos de *H. vertebralis* fueron colectados en Sevilla de Oro, en la provincia del Azuay. Las colecciones fueron permitidas bajo la autorización 016-IC-FAU-DNBAP-MA del Ministerio del Ambiente. Los individuos adultos de *D. auratus* provienen de una donación del Zoológico de Atlanta de los Estados Unidos de América. Esta rana es común en Centroamérica y el norte de Suramérica.

4.2 PROCESAMIENTO Y FIJACIÓN DE LOS EMBRIONES

4.2.1 SOLUCIONES Y FIJATIVOS

4.2.1.1 SOLUCIÓN DE STEINBERG (Rugh, 1965)

- 58 mM NaCl
- 0.65 mM KCl₂
- 0.85 mM MgSO₄
- 5 mM Tris, pH 8
- 0.34 mM Ca (NO₃)₂

4.2.1.2 PBS (TAMPÓN DE FOSFATO SALINO)

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

4.2.1.3 FIJATIVO SMITH

4.2.1.3.1 SOLUCIÓN A

- 10 gramos dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en 1 litro de agua destilada.

4.2.1.3.2 SOLUCIÓN B

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

El fijativo Smith se prepara inmediatamente antes de usar, utilizando una proporción 1 : 1 de las soluciones A (4.2.1.3.1) y B (4.2.1.3.2).

4.2.1.4 FIJATIVO MEMFA

- 0.1 M MOPS pH 7.4
- 2 mM EGTA
- 1mM MgSO_4
- 3.7 % Formaldehído.

4.2.2 PROCESAMIENTO DE LOS EMBRIONES

Los embriones de las dos especies de ranas fueron manipulados y observados en una solución de Steinberg al 15% (4.2.1.1). Las observaciones de los embriones se realizaron a temperatura ambiente dentro del laboratorio. Para las observaciones, se utilizó el estereomicroscopio WILD Heerbrugg e iluminación con lámparas de fibra óptica KL 1500 (Zeiss).

Se determinó los estadios del desarrollo de los embriones de acuerdo a la tabla de estadios del desarrollo descrita para *E. machalilla* (del Pino *et al.*, 2004; Anexo 6).

4.2.3 FIJACIÓN DE LOS EMBRIONES

La fijación de los embriones se realizó de acuerdo a los métodos descritos para *E. machalilla* (del Pino *et al.*, 2004). Los embriones de *H. vertebralis* y *D. auratus*, fueron manipulados con pinzas de relojero para retirar las capas de gelatina. Los embriones fueron fijados en Smith (4.2.1.3) o MEMFA (4.2.1.4) de la manera que se describe a continuación. Una vez fijados, los embriones fueron almacenados en tubos Eppendorf, marcados con el número de registro, la fecha de fijación, estadio y cantidad de embriones fijados.

4.2.3.1 FIJACIÓN CON SMITH

Los embriones, sin capas de gelatina, fueron fijados durante 24 horas en el fijativo Smith (4.2.1.3), a temperatura ambiente. Durante este proceso los embriones permanecieron en cajas oscuras. A continuación, los embriones fueron lavados con agua

destilada para eliminar el fijativo. Finalmente, se almacenó los embriones en una solución 2:3 de formaldehído 10% y PBS 1X (4.2.1.2), a 4 °C.

4.2.3.2 FIJACIÓN CON MEMFA

Los embriones, sin membrana vitelina, fueron incubados en el fijativo MEMFA (4.2.1.4) durante 2 horas y 30 minutos, a temperatura ambiente. Luego, los embriones fueron transferidos a metanol al 100%; y almacenados en tubos Eppendorf de 1.5 ml, a -20 °C.

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

4.3.1 SECCIONES DE VIBRATOMO

Los embriones de las dos especies de ranas dendrobátidas, previamente fijados en Smith (4.2.1.3), fueron transferidos a un gel de agarosa al 6%. Cuando el gel de agarosa se solidificó, se cortó un cubo de agarosa que contenía al embrión. Los cubos de agarosa fueron adheridos, con pegamento instantáneo, a un porta-tejidos. Subsiguientemente, el porta-tejidos fue asegurado en la plataforma del Vibratomo Oxford. El contenedor del Vibratomo se llenó de agua destilada para recoger las secciones. Se realizaron secciones horizontales, sagitales y transversales de 50 μm de espesor, utilizando una cuchilla metálica de la marca Gillette. Las secciones fueron realizadas con una velocidad de 2.5, una amplitud de 6 y un ángulo de 25°. Una vez cortadas, las secciones fueron transferidas y almacenadas en una solución de 2:3 de formaldehído 10% y PBS 1X (4.2.1.2), a 4 °C.

4.3.2 TINCIÓN FLOURESCENTE PARA NÚCLEOS CELULARES

Las secciones de Vibratomo fueron teñidas con el tinte fluorescente Hoeschst 33258, el cual se acopla al ADN celular y posibilita la detección de núcleos celulares. Las secciones fueron lavadas en PBS (4.2.1.2) y colocadas en posillos de plástico. Fueron incubadas por 20 minutos en una solución de 1 μ l de Hoeschst 33258 en 1 ml de PBS (4.2.1.2). La incubación se realizó a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente las secciones fueron lavadas 5 veces con PBS (4.2.1.2), y almacenadas en glicerol. Finalmente se preparó el montaje, de las secciones teñidas, en placas. Las secciones fueron transferidas a un portaobjetos de cristal con una gota de glicerol, y fueron cubiertas con un cubreobjetos. Las placas fueron almacenadas a 4 °C, hasta ser observadas y fotografiadas.

4.4 INMUNODETECCIÓN EN MONTAJE ENTERO

4.4.1 SOLUCIONES Y TAMPONES

4.4.1.1 TBS-Tr

- 10 mM Tris pH 8
- 140 mM NaCl
- 0.1% Tritón-X

4.4.1.2 TBTM

- TBS-Tr (4.4.1.1)
- 2 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA)

- 5 % de leche en polvo descremada

4.4.1.3 TAMPÓN DIG

- 100 mM Tris/HCl pH 9.5
- 100 mM NaCl
- 50 mM MgCl₂

4.4.1.4 TAMPÓN 4

- 10 mM Tris pH 8
- 1 mM EDTA pH 8

4.4.1.5 SOLUCIÓN NBT

- 50 mg/ml NBT (nitroazul de tetrazolio)
- 70 % Dimetilformamida

4.4.1.6 SOLUCIÓN BCIP

- 50 mg/ml BCIP (5-bromo-4cloro-3-indolil fosfato)
- 100% dimetilformamida

4.4.1.7 REACTIVO DE COLOR

- 33 µl solución NBT (4.4.1.5)
- 16,5 µl solución BCIP (4.4.1.6)
- 5 ml tampón DIG (4.4.1.3)

4.4.2 INMUNODETECCIÓN

La técnica de inmunodetección en embriones enteros, se basó en los protocolos de Benítez y del Pino, (2002) y Kispert y Herrmann (1994); e incorpora modificaciones de acuerdo a Kuratani y Horigome (2000).

4.4.2.1 PERMEABILIZACIÓN DE LOS EMBRIONES

Los embriones, previamente fijados en el fijativo MEMFA (4.3.3.2), fueron transferidos a tubos Eppendorf de 2 ml que contenían una solución 1:1 de DMSO (Dimetil Sulfoxido)/Metanol. Los embriones fueron incubados en esta solución durante 24 horas a una temperatura de -20 °C. Subsiguientemente, se reemplazó la mitad de la solución DMSO/Metanol con Tritón-X al 10%, y se incubó a los embriones durante 30 minutos, a temperatura ambiente. La incubación con Tritón-X permite la entrada del anticuerpo a las células, ya que este compuesto es un detergente que permeabiliza las membranas. Finalmente, se realizaron 5 lavados cada 10 minutos con TBS-Tr (4.4.1.1).

4.4.2.2 BLOQUEO DE LA UNIÓN NO ESPECÍFICA

Para el bloqueo de la unión no específica del anticuerpo, se incubó a los embriones en TBTM (4.4.1.2), durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizada esta incubación, se reemplazó la solución anterior con una mezcla de 20 % de suero de cabra en TBTM (4.4.1.2), durante una hora a temperatura ambiente.

4.4.2.3 INCUBACIÓN DEL ANTICUERPO PRIMARIO

El anticuerpo primario que se utilizó fue el 12/101. El anticuerpo monoclonal 12/101 reacciona contra las proteínas de las miofibrillas, que tienen un peso molecular de 102 kDa (Kintner y Brockes, 1985).

La solución TBTM (4.4.1.2) con 20 % de suero de cabra fue reemplazada por una solución de 10 % de suero de cabra en TBTM (4.4.1.2), en la cual se diluyó el anticuerpo primario. La dilución del anticuerpo primario 12/101 fue 1:2. Los embriones fueron incubados en la solución con anticuerpo primario durante 72 horas a 4 °C. Durante este proceso, el tubo contenedor de los embriones fue rotado periódicamente.

4.4.2.4 LAVADO DEL ANTICUERPO PRIMARIO

Al finalizar el tiempo de incubación, se reemplazó la solución del anticuerpo primario con TBS-Tr (4.4.1.1). Con esta solución se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 2 lavados cada 30 minutos, a temperatura ambiente. Finalmente se realizó un último lavado por 24 horas a 4 °C.

4.4.2.5 INCUBACIÓN DEL ANTICUERPO SECUNDARIO

El anticuerpo secundario utilizado fue anti-mouse IgG acoplado a la fosfatasa alcalina. La dilución de este anticuerpo fue de 1:500.

La solución de TBS-Tr (4.4.1.1), fue reemplazada por una solución de TBTM (4.4.1.2) con 10 % de suero de cabra, donde se diluyó el anticuerpo secundario anti-

mouse. Los embriones fueron incubados en la solución con el anticuerpo secundario durante 24 horas a 4 °C.

4.4.2.6 LAVADO DEL ANTICUERPO SECUNDARIO

Al finalizar la incubación del anticuerpo secundario, se realizaron lavados con TBS-Tr (4.4.1.1). Se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 2 lavados cada 30 minutos, a temperatura ambiente. Finalmente se realizó un último lavado por 24 horas a 4 °C.

4.4.2.7 REACCIÓN DE COLOR

Los embriones fueron transferidos a pocillos de plástico, donde se realizaron 2 lavados de 10 minutos con tampón DIG (4.4.1.3). Luego, se realizaron 2 lavados, de 10 minutos, con 5 mM de levamisol en tampón DIG (4.4.1.3). Posteriormente, los embriones fueron incubados en el reactivo de color (4.4.1.7), a temperatura ambiente y en la oscuridad. Este proceso se llevó a cabo hasta obtener una reacción positiva. Una vez que la reacción tuvo lugar, se procedió a detenerla mediante el lavado con tampón 4. Luego, los embriones fueron fijados en 4% de formaldehído durante 24 horas. Finalmente, se realizaron varios lavados con PBS (4.2.1.2) y se almacenó los embriones en pocillos con glicerol.

4.5 PROCESAMIENTO DE EMBRIONES INMUNOTEÑIDOS

4.5.1 SOLUCIONES

4.5.1.1 BB/BA

- 2:1 Benzilbenzoato: alcohol bencílico.

4.5.1.2 SSC

- Tampón de cloruro y citrato de sodio.

4.5.2 DESPIGMENTACIÓN DE EMBRIONES

Una vez terminado el proceso de inmunodetección, los embriones fueron sometidos a un proceso de despigmentación. Este proceso se realizó debido a que los embriones de ranas dendrobátidas poseen células pigmentadas, lo cual dificulta la observación.

Los embriones fueron postfijados en la solución Smith B (4.2.1.3.2) durante 24 horas a 4 °C. Esta fijación se realizó con el objetivo de evitar que la tinción desaparezca durante el proceso de despigmentación. Luego, se realizaron varios lavados con PBS (4.2.1.2). Se transfirió a los embriones a un frasco de vidrio que contenía 1% de H₂O₂, 5% de formamida y 0.5x de SSC (4.5.1.2). El frasco fue colocado bajo la luz solar durante una o dos horas. Finalmente, se lavó los embriones con PBS (4.2.1.2) y se los almacenó en glicerol.

4.5.3 ACLARAMIENTO DE EMBRIONES

Para facilitar la observación de la reacción de inmunodetección, se utilizó BB/BA (4.5.1.1). Esta solución permite que la yema del embrión se vuelva transparente, ya que el BB/BA (4.5.1.1) y la yema tienen el mismo índice de refracción. Los embriones fueron

colocados en un recipiente que contenía PBS (4.2.1.2). El PBS (4.2.1.2) fue gradualmente reemplazado por metanol hasta alcanzar la concentración al 100% de metanol. Este paso permite la eliminación del agua dentro de los tejidos embrionarios, ya que el BB/BA (4.4.1.8) no es un compuesto miscible. Finalmente los embriones fueron transferidos a una placa de depresión con BB/BA (4.4.1.8). Luego de unos minutos los embriones fueron observados y fotografiados.

4.6 FOTOGRAFÍA DE EMBRIONES ENTEROS, SECCIONES, PLACAS Y EMBRIONES INMUNOTEÑIDOS

Los embriones enteros, inmunoteñidos y las secciones sin tinción de núcleos, fueron fotografiados utilizando un estereoscopio Stemi SV6, de Carl Zeiss. Estas imágenes fueron tomadas utilizando luz directa. Las placas con tinción de núcleos fueron fotografiadas utilizando un microscopio AxioObserver.Z1, de Carl Zeiss. Para estas fotografías, se utilizó microscopía de fluorescencia. Para todas las fotografías se utilizó la cámara AxioCam y el programa de procesamiento de imágenes Axiovision 4.6.3. Las imágenes obtenidas fueron editadas utilizando el programa Adobe Photoshop CS5.

5. RESULTADOS

5.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LOS EMBRIONES DE *Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates auratus*.

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

En el presente trabajo se observó que la tasa del desarrollo de *H. vertebralis* es similar a la tasa del desarrollo de *E. machalilla* (del Pino *et al.*, 2004). Por lo que *H. vertebralis* se considera una especie con tasa de desarrollo lento. El diámetro del huevo de *H. vertebralis* es de 2.6 mm.

5.1.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LOS EMBRIONES DE *H. vertebralis*.

5.1.1.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA TEMPRANA (ESTADIO 14) DE *H. vertebralis*.

La figura 1A muestra el plano de la sección transversal en las figuras 1C y 1D. En la néurula temprana de *H. vertebralis* (Fig. 1B) se observó la placa neural y los pliegues neurales elevados, en los extremos de la placa neural. En la región rostral los pliegues neurales fueron más prominentes. En la sección transversal (Fig. 1C) se observó la gruesa placa neural, el notocordio y el mesodermo presomítico. Se observó que el techo del arquenterón está cubierto por el endodermo.

La figura 1D corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de la tinción transversal. En esta sección, se pudo diferenciar el ectodermo de piel del ectodermo de la placa neural. Se observó que las células ectodermales de los pliegues neurales tienen una forma alargada y son más compactas que las células del ectodermo de piel. Se observó claramente el límite entre el mesodermo presomítico y el notocordio. Las células del mesodermo presomítico tienen una forma redondeada y se encuentran desorganizadas. Las células ectodermales, que cubren el arquenterón, son más grandes que las células del mesodermo.

5.1.1.2 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA MEDIA (ESTADIO 15) DE *H. vertebralis*.

La figura 2A muestra la orientación de las secciones en las figuras 2C y 2D. La figura 2B muestra la morfología externa de la néurula media de *H. vertebralis*. En la néurula media, se observó que los pliegues neurales se han acercado en la línea media del cuerpo. Como resultado de este acercamiento se ha formado el surco neural en la parte media de la placa neural. La figura 2C corresponde a una sección transversal de la néurula media. En esta sección, se observó que los pliegues neurales se encuentran en la línea media del embrión. Los pliegues neurales no se han fusionado por lo que el tubo neural se encuentra abierto. Se pudo distinguir las células ectodermales que formarán el tubo neural. El notocordio no se pudo diferenciar claramente en esta sección.

La figura 2D muestra la disposición celular de la sección transversal. Las células de los pliegues neurales han cambiado su organización y se encuentran más compactas. Estas células tienen forma alargada. En esta sección el límite entre el mesodermo presomítico y el notocordio no se pudo distinguir claramente, debido a que el área

donde fue realizada la sección corresponde una región posterior del embrión. Se observó que las células del mesodermo presomítico se han compactado en el lugar donde se formarán los somitas. Se observó que las células del endodermo son alargadas y más grandes que las células mesodermales.

5.1.1.3 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA TARDÍA (ESTADIO 16) DE *H. vertebralis*.

En la figura 3A se observa un esquema de la orientación de las secciones en las figuras 3C y 3D. En la néurula tardía de *H. vertebralis* (Fig. 3B) se observó que los pliegues neurales se han fusionado y por lo tanto el tubo neural se ha formado. Se pudo distinguir la cabeza en la zona rostral. Se distinguen los tres arcos branquiales y los pronefros a cada lado del embrión. La figura 3C muestra una sección transversal de la néurula tardía. El tubo neural tiene forma cilíndrica y se encuentra en la zona medial del cuerpo. El notocordio es distinguible y tiene forma redonda. El mesodermo presomítico se ha segmentado y se observaron los somitas a los lados del notocordio.

En la tinción fluorescente de núcleos de otra sección transversal (Fig. 3D), se observó que el tubo neural tiene forma cilíndrica, y se encuentra en la región dorsal medial del embrión. Las células ectodermales del tubo neural son más alargadas y compactas que las células del ectodermo de piel. Las células del somita son redondeadas, compactas y sin organización determinada. No se observó diferenciación dentro del somita.

La figura 4A muestra la orientación de las secciones en las figuras 4B y 4C. En la figura 4B se observa una sección horizontal de la néurula tardía. El mesodermo presomítico se ha segmentado en 4 somitas. En esta sección se pudo observar un quinto

somita formándose caudalmente a los 4 somitas. En la región caudal se observó una región grande del mesodermo presomítico no segmentado. En la sección horizontal con tinción fluorescente de núcleos (Fig. 4C) se observaron las células de los somitas compactadas y redondeadas.

5.1.1.4 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE YEMA DE LA COLA (ESTADIO 17) DE *H. vertebralis*.

La figura 5A muestra la orientación de las secciones en las figuras 5C y 5D. En el embrión entero del estadio de yema de la cola (Fig. 5B) se observó la presencia de la yema de la cola y la forma arqueada de los embriones, que se desarrollan sobre la masa de yema. En este estadio ya se pudo diferenciar los cuatro arcos branquiales y los pronefros en la zona lateral de la cabeza del embrión. En la sección transversal del estadio de yema de la cola (Fig. 5C) se pudo distinguir el tubo neural en la zona media del cuerpo. El notocordio se ubica bajo el tubo neural. Se observaron los somitas a los lados del tubo neural y el notocordio. No se observó diferenciación dentro de los somitas. La figura 5D muestra la disposición celular de una sección transversal. Las células de los somitas son redondeadas y no se observó la presencia del miocele.

La figura 6A muestra la orientación de las secciones en las figuras 6B y 6C. En la sección horizontal del embrión en estadio de yema de la cola (Fig. 6B) se observaron los somitas a los dos lados del notocordio. La figura 6C corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de una sección horizontal. Los somitas rostrales se observaron como bloques de células independientes. En la zona caudal del embrión, el mesodermo presomítico aún no se ha segmentado. En las secciones 6B y 6C no se pudo observar el número total de somitas. En el estadio de yema de la cola, se encontraron 9 pares de

somitas aproximadamente. La figura 6D muestra dos somitas de la figura 6C. Las células dentro de los somitas se encuentran más compactadas que en la néurula tardía, pero aún presentan forma redonda y no tienen un arreglo definido.

5.1.1.5 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE ARCOS BRANQUIALES (ESTADIO 18.5) DE *H. vertebralis*.

La figura 7A muestra la orientación de las secciones en las figuras 7C y 7D. En el embrión del estadio de arcos branquiales (Fig. 7B) se observaron los arcos branquiales en la zona lateral de la cabeza del embrión. Se observó el arco mandibular, seguido por el arco hiodeo y el arco branquial. Las vesículas ópticas y los pronefros también fueron visibles en la zona lateral de la región cefálica. En la sección transversal (Fig. 7C) y en la tinción fluorescente de núcleos (Fig. 7D) se observó que las células de los somitas se encuentran más compactadas en comparación con el estadio de yema de la cola; pero no aún no se han diferenciado en esclerotoma y dermomiótoma.

La figura 8A muestra la orientación de las secciones en las figuras 8B y 8C. La figura 8B corresponde a una sección horizontal del embrión. En esta sección se pudo distinguir el cerebro embrionario en la zona rostral. Se observaron las tres vesículas cerebrales: el cerebro anterior o prosencéfalo, cerebro medio o mesencéfalo, y cerebro posterior o rombencéfalo. Las vesículas ópticas ya se han formado a nivel del cerebro posterior. En la tinción fluorescente de núcleos de la sección horizontal (Fig. 8C) se observó la región del tubo neural que corresponde al cordón espinal y el mesodermo presomítico en la zona caudal. En las secciones 8B y 8C no se observaron todos los somitas. En este estadio se encontraron entre 12 y 14 pares de somitas. Se observó que los somitas rostrales son más grandes y distinguibles.

La figura 8D muestra el acercamiento de una sección con tinción fluorescente de núcleos. Se pudo observar que las células han empezado a organizarse y se observaron mioblastos alargados y mononucleados. Sin embargo, las células alargadas no se intercalan ni alcanzan la longitud del somita.

5.1.1.6 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE YEMA DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 19) DE *H. vertebralis*.

En la figura 9A se observa la orientación de las secciones en las figuras 9C, 9D y 9E. En el embrión entero del estadio de yema de las branquias (Fig. 9B) se observó que el arco mandibular y el arco hiodeo se encuentran más desarrollados que en el estadio de arcos branquiales. La yema del primer par de branquias es visible. Se observó el estomodeo en la zona rostral. La figura 9C corresponde a un esquema de una sección transversal. En este esquema se observa a los somitas diferenciados en esclerotoma y dermomiótoma. En la sección transversal del embrión (Fig. 9D) se observaron los somitas diferenciados en esclerotoma y dermomiótoma. El esclerotoma se encuentra adyacente al tubo neural y contiene poca cantidad de células, arregladas más espaciadamente. El dermomiótoma ocupa la región dorsal, lateral y ventral del somita. Contiene mayor número de células que se agrupan compactamente. En la zona dorsal del tronco se observó la aleta dorsal del embrión conformada por ectodermo. En la figura 9E se observa una tinción fluorescente de núcleos de una sección transversal. Los mioblastos dentro de los somitas son mononucleados. Lateral a los somitas, se observan los túbulos pronéfricos.

La figura 10A muestra la orientación de las secciones en las figuras 10B y 10C. En la sección horizontal (Fig. 10B) se observaron los arcos mandibular e hiodeo en la

zona rostral del embrión. La yema del primer par de branquias ya es distinguible. En esta sección sólo se logró distinguir 15 pares de somitas. En este estadio se identificaron hasta 19 pares de somitas a los lados del tubo neural. La figura 10C corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de una sección horizontal. Se observó que los mioblastos de los somitas son alargados, mononucleados y se encuentran intercalados entre sí. La figura 10C muestra sólo los somitas rostrales. En los somitas caudales se observaron células redondeadas y desordenadas.

5.1.1.7 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE DESARROLLO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 20.5) DE *H. vertebralis*.

Las figuras 11A y 11B muestran la orientación de las secciones en las figuras 11D y 11E, respectivamente. En el embrión entero del estadio de desarrollo de las branquias (Fig. 11C) se observó que el primer par de branquias se ha ramificado y tiene 4 ramas. Se observó la yema del segundo par de branquias. En la sección transversal (Fig. 11D) se observaron los somitas diferenciados en esclerotoma y dermomiótoma. La diferenciación del somita es más acentuada que en el estadio de yema de las branquias. En la zona dorsal del embrión se observó la aleta dorsal, más desarrollada y alargada que en el estadio de yema de las branquias.

En la sección horizontal del embrión (Fig. 11E) se observó la diferenciación secundaria del cerebro embrionario en cinco vesículas: dos vesículas del cerebro anterior (telencéfalo y diencefalo), una del cerebro medio (mesencéfalo), y dos del cerebro posterior (metencéfalo y mielencéfalo). Se pudieron observar las vesículas ópticas. Los somitas rostrales son más grandes y desarrollados que los caudales. En los somitas rostrales se pudo identificar los mioblastos alargados. En la figura 11E no se observan

todos los somitas. En el embrión en el estadio de desarrollo de las branquias se contabilizaron aproximadamente 24 pares de somitas.

5.1.1.8 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE BRANQUIAS EN DESARROLLO (ESTADIO 22) DE *H. vertebralis*.

La figura 12A corresponde a un esquema que muestra la orientación de la sección en la figura 12C. En el embrión entero del estadio de branquias en desarrollo (Fig. 12B) se observó que el primer par de branquias tiene 6 ramificaciones. El cuerpo del embrión está pigmentado y la vesícula óptica es prominente. La invaginación del estomodeo es mayor que en estadios anteriores. En la sección horizontal del embrión (Fig. 12C) se observaron los arcos branquiales y los dos pares de branquias. La vesícula óptica está más desarrollada. Se observó el intestino anterior o faringe a nivel de las vesículas ópticas. Los somitas se extienden a lo largo del embrión. Se observó que los somitas más rostrales eran más grandes. La zona ventral de cada somita presenta células más espaciadas y corresponde al esclerotoma. En la sección de la figura 12C no se pudo observar todos los somitas. En este estadio se encontraron 26 pares de somitas localizados a los lados del tubo neural.

5.1.1.9 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE DESARROLLO COMPLETO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 23) DE *H. vertebralis*.

La figura 13A muestra la orientación de las secciones en las figuras 13D y 13E. La figura 13B corresponde a un esquema que muestra la ramificación de las branquias en

el estadio de desarrollo completo de las branquias. En este estadio se observó que el primer par de branquias tiene 8 ramificaciones. El segundo par de branquias no se ha ramificado todavía. En el embrión entero del estadio de desarrollo completo de las branquias (Fig. 13C) se observó que el ojo del embrión ya se ha formado. En la sección sagital (Fig. 13D) se pudo distinguir las vesículas cerebrales y el ojo en la cabeza del embrión. Se observaron las vesículas óticas a nivel del cerebro posterior. El intestino y el corazón se han desarrollado; y se observa la aorta dorsal a lo largo de la aleta de la cola del embrión. La zona ventral de cada somita presenta células más espaciadas y corresponde al esclerotoma. En la sección de la figura 13B no se pudo identificar todos los somitas. En el estadio de desarrollo completo de las branquias se encontraron 30 pares de somitas.

La figura 13E corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de una sección sagital. En esta sección, se observó la región media del tronco. Los mioblastos se han alargado de manera rostro-caudal y han alcanzado la longitud de cada somita.

5.1.1.10 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL EMBRIÓN A LA ECLOSIÓN (ESTADIO 25) DE *H. vertebralis*.

La figura 14A muestra la orientación de las secciones en las figuras 14B y 14C. La figura 14B corresponde a una sección horizontal de un embrión a la eclosión. En esta sección se observó el cerebro embrionario y el ojo del embrión. Las vesículas óticas son más grandes que en estadios previos. Se observaron los pronefros ubicados de manera rostral al endodermo. No se observa el intestino del embrión. Los somitas a lo largo del embrión se han diferenciado en esclerotoma y dermomiótoma. La zona ventral de cada somita presenta menor número de células. Esta zona corresponde al esclerotoma. En la

tinción fluorescente de núcleos de la sección horizontal (Fig. 14C) se observaron los mioblastos alargados dentro de los somitas. Los mioblastos alcanzan la longitud de cada somita y se encuentran paralelos al tubo neural y al notocordio. Los mioblastos de los somitas más caudales, son alargados y se han intercalado. En las secciones de las figuras 14B y 14C no se pudo observar todos los somitas. El embrión a eclosionar presenta aproximadamente 33 pares de somitas.

5.1.2 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LOS EMBRIONES DE *D. auratus*.

5.1.2.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA TEMPRANA (ESTADIO 14.5) DE *D. auratus*.

La figura 15A muestra la orientación de las secciones en las figuras 15C y 15D. En la néurula temprana de *D. auratus* (Fig. 15B) se observó la placa neural. Los pliegues neurales se han elevado a los extremos de la placa neural. En la sección transversal del embrión (Fig. 15C) se pudo distinguir los pliegues neurales, y el límite entre el mesodermo presomítico y el notocordio.

La figura 15D corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de la sección transversal. En esta sección, se observó la gruesa placa neural que se distingue del ectodermo de piel. Se pudo diferenciar con mayor claridad el notocordio y el mesodermo presomítico. Las células del mesodermo presomítico son redondeadas y se encuentran desordenadas. En las secciones transversales de las figuras 15C y 15D se observó que el techo del arquenterón está cubierto por el endodermo.

5.1.2.2. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA MEDIA (ESTADIO 15) DE *D. auratus*.

La figura 16A muestra la orientación de las secciones en las figuras 16C y 16D. En la néurula media de *D. auratus* (Fig. 16B) se observó que los pliegues neurales se acercan en la línea media del embrión. El acercamiento de los pliegues neurales determina la formación del surco neural en la zona media de la placa neural. En la sección transversal de la néurula media (Fig. 16C) se observó la gruesa placa neural y los pliegues neurales elevados. El tubo neural aún no se ha cerrado. El endodermo ha cubierto totalmente el techo del arquenterón.

En la figura 16D se observa una tinción fluorescente de núcleos de una sección transversal. En esta sección, se pudo distinguir claramente el límite entre el mesodermo presomítico y el notocordio. Las células endodermales son de mayor tamaño que las células mesodermales. Las células mesodermales son redondeadas, se encuentran desordenadas.

5.1.2.3 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA TARDÍA (ESTADIO 16.5) DE *D. auratus*.

La figura 17A muestra la orientación de las secciones en las figuras 17C y 17D. En la figura 17B se observa un embrión entero en néurula tardía de *D. auratus*. En la néurula tardía se observó que los pliegues neurales se han fusionado en la línea media y por lo tanto el tubo neural ya se ha formado. En la zona rostral del embrión, se pudo distinguir el arco mandibular, seguido del arco hiodeo y el arco branquial; y los pronefros. En la sección horizontal del embrión (Fig. 17C) se observó que el mesodermo

paraxial se ha segmentado en 5 somitas. La figura 17D corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de una sección horizontal. En esta sección, se observaron 5 somitas y el mesodermo presomítico en la zona caudal. Las células de los somitas son redondas y se encuentran compactadas.

La figura 18A muestra la orientación de las secciones en las figuras 18B y 18C. La figura 18B muestra una sección transversal a través del tronco. El tubo neural se ha cerrado y el notocordio es totalmente distinguible. Los somitas son distinguibles a los dos lados del tubo neural y del notocordio. La figura 18C muestra la tinción fluorescente de una sección transversal. En esta sección se observó que las células ectodermales del tubo neural se encuentran compactadas y tienen una forma alargada.

La figura 18D corresponde a un acercamiento de un somita de la figura 18C. En esta sección se observaron las células redondeadas y desordenadas dentro del somita. No se observa diferenciación de las partes somita.

5.1.2.4 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE ARCOS BRANQUIALES (ESTADIO 18) DE *D. auratus*.

La figura 19A muestra la orientación de las secciones en las figuras 19C y 19D. En el embrión entero del estadio de los arcos branquiales (Fig. 19B) se observaron los arcos branquiales en la zona rostral del embrión. Se observa el arco mandibular en la zona más rostral, seguido del arco hiodeo y arco branquial. Los pronefros fueron visibles a los lados del embrión. En la sección horizontal del embrión (Fig. 19C) se observó el cerebro embrionario diferenciado. En esta sección sólo se observaron dos vesículas cerebrales: el cerebro anterior o prosencéfalo, y el cerebro medio o mesencéfalo. Las vesículas ópticas se han empezado a formar como dos evaginaciones del diencéfalo. La orientación de

corte de la sección 19C permitió observar la faringe, a nivel de los arcos branquiales. La figura 19D corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de una sección horizontal. En esta sección, se observaron los somitas y el mesodermo presomítico en la zona caudal. Se observaron los somitas rostrales de mayor tamaño que los caudales. En las secciones 19C y 19D no se pudo observar todos los somitas. En el estadio de arcos branquiales se observaron 15 pares de somitas aproximadamente.

La figura 20A muestra la orientación de las secciones en las figuras 20B y 20C. La figura 20B y la tinción fluorescente de núcleos de la figura 20C corresponden a secciones transversales a través del tronco. En estas secciones, se observó el notocordio de forma redonda y el tubo neural en la zona dorsal medial del cuerpo. En este estadio, los somitas se observan como bloques compactos de células redondeadas, pero no se han diferenciado. La tinción fluorescente de la figura 20D corresponde a un acercamiento de un somita de una sección transversal. En esta sección se pudo observar que las células dentro del somita se encuentran compactadas. Las células mantienen su forma redondeada y no se observó alargamiento de los mioblastos.

5.1.2.5 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE YEMA DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 19) DE *D. auratus*.

La figura 21A muestra la orientación de las secciones en las figuras 21C y 21D. En la figura 21B se observa un embrión entero del estadio de yema de las branquias. En este estadio se observó que el arco mandibular y el arco hiodeo son más prominentes que en estadios anteriores. La yema del primer par de branquias se ha desarrollado. Se observó el estomodeo en la zona rostral del embrión. La figura 21C corresponde a un esquema de una sección transversal que muestra los somitas diferenciados. En la sección

transversal del embrión (Fig. 21D) se observaron los somitas diferenciados en esclerotoma y dermomitoma. En la zona ventral, adyacente al tubo neural, se observó el esclerotoma. Esta región consta de células menos compactadas. En la zona lateral y dorsal del somita se ha diferenciado el dermomiótoma. Las células en esta región se encuentran más compactadas y son más numerosas. Se observaron los pronefros ubicados lateralmente a los somitas.

La figura 22A muestra la orientación de las secciones en las figuras 22B y 22C. En la sección horizontal del embrión (Fig. 22B) se identificó el cerebro anterior y el cerebro medio en la zona rostral. La faringe se ubica de manera caudal al cerebro embrionario. Se observó que los arcos branquiales son más grandes que en estadios previos. La figura 22C corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de una sección horizontal. En esta sección, se observaron los somitas a los lados del notocordio. Los somitas más rostrales son más grandes e independientes. En la sección 22B y 22C no se observaron todos los somitas. En este estadio se observaron 20 pares de somitas. La figura 22D corresponde a un acercamiento de los somitas más rostrales de la imagen 22C. Se observaron mioblastos alargados e intercalados dentro de cada somita. Los mioblastos no alcanzaban la longitud del somita.

5.1.2.6 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE DESARROLLO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 20) DE *D. auratus*.

En la figura 23A se observa la orientación de las secciones en las figuras 23C y 23D. En el embrión entero del estadio de desarrollo de las branquias (Fig. 23B) se observó que el primer par de branquias ha empezado a ramificarse. La invaginación del estomodeo es más grande en comparación con estadios anteriores. En la sección

horizontal del embrión (Fig. 23C) se observaron los somitas como paquetes de células independientes a los lados del tubo neural. Debido a la curvatura del embrión, en esta sección no se pudo identificar todos los somitas.

La figura 23D corresponde a una tinción fluorescente de núcleos de la sección horizontal. En esta sección se observó que los mioblastos mononucleados, dentro del somita, se han alargado más que en el estadio 19. Los mioblastos no han alcanzado la longitud del somita. Se observó que la región que se encuentra adyacente al tubo neural tenía menor concentración de células. Esta zona corresponde al esclerotoma. En las secciones de las figuras 23C y 23D no se observaron todos los somitas. En el estadio de desarrollo de las branquias se pudieron observar aproximadamente 23 pares de somitas.

5.1.2.7 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE BRANQUIAS EN DESARROLLO (ESTADIO 22) DE *D. auratus*.

La figura 24A corresponde a un esquema que muestra la orientación de las secciones en las figuras 24B y 24C. La figura 24B corresponde a una sección horizontal de un embrión del estadio de branquias en desarrollo. En esta sección, se observó mayor desarrollo del arco mandibular y el arco hiodeo, siendo el arco mandibular más grande. Las ramas de las branquias fueron distinguibles. Se observó que los somitas se encuentran más desarrollados e independientes que en estadios anteriores.

En la figura 24C se observa una tinción fluorescente de núcleos de una sección horizontal. En esta sección se observaron los somitas de la región media del tronco. Los mioblastos han alcanzado la longitud de cada somita y tienen orientación paralela al notocordio. Los somitas más caudales no se observaron en la sección de la figura 24C. En los somitas más caudales se observaron mioblastos intercalados entre sí y que no

alcanzaban la longitud del somita. En las secciones de las figuras 24B y 24C no se observaron todos los somitas. En el estadio de branquias en desarrollo se contabilizaron 27 pares de somitas.

5.1.2.8 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DEL ESTADIO DE DESARROLLO COMPLETO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 23) DE *D. auratus*.

La figura 25A muestra la orientación de las secciones en las figuras 25D y 25E. La figura 25B muestra un esquema de las branquias de un embrión en estadio de desarrollo completo de las branquias. En este estadio se observó que el primer par de branquias tiene nueve ramificaciones. El segundo par de branquias tiene dos ramificaciones. La figura 25C corresponde a un embrión entero del estadio de desarrollo completo de las branquias. En este estadio se observó que el embrión tiene pigmento. La figura 25D corresponde a una sección horizontal a través del cerebro y el tubo neural del embrión. En esta sección, se observó el cerebro anterior y cerebro medio. El ojo del embrión tiene pigmento y se observó el cristalino. Las vesículas óticas son grandes.

La figura 25E corresponde a una sección horizontal a través del notocordio. En esta sección, se observaron los túbulos de los pronefros a cada lado del embrión ubicados rostralmente al endodermo. En este estadio los mioblastos alcanzan la longitud del somita y se orientan paralelamente entre ellos, y con el notocordio. En la sección 25D sólo se observaron algunos somitas. El embrión en estadio de desarrollo completo de las branquias presentó 30 pares de somitas.

5.2 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MUSCULARES EN *Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates auratus*.

El estudio de la expresión de proteínas musculares fue realizado mediante la inmunodetección en montaje entero con el anticuerpo monoclonal 12/101. Este anticuerpo reacciona contra las proteínas musculares de las miofibrillas (Kintner y Brockes, 1985).

5.2.1 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS MIOFIBRILLAS EN *H. vertebralis*.

5.2.1.1 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS MIOFIBRILLAS EN LA NÉURULA TARDÍA (ESTADIO 16) Y EL ESTADIO DE YEMA DE LA COLA (ESTADIO 17.5) DE *H. vertebralis*.

La figura 26 corresponde a la néurula tardía de *H. vertebralis*, con inmunodetección con el anticuerpo 12/101. En este estadio se observó reacción no específica en la zona dorsal del embrión. La tinción no se limitó a los somitas, también se encontró en una zona que corresponde al endodermo del embrión. En la observación morfológica de la néurula tardía (Fig. 4B) se observaron 4 somitas. Sin embargo, por inmunodetección con el anticuerpo 12/101 los somitas no pudieron ser identificados en la néurula tardía.

Las figuras 27A y 27B corresponden a embriones del estadio de yema de la cola con inmunodetección con el anticuerpo 12/101. Se observó que la expresión de las proteínas de las miofibrillas fue más fuerte en los 9 somitas rostrales. En la figura 27A se

observó que el mesodermo presomítico, en la zona caudal del embrión, no expresó proteínas de las miofibrillas que se detectan con el anticuerpo 12/101.

5.2.1.2 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS MIOFIBRILLAS EN EL ESTADIO DE ARCOS BRANQUIALES (ESTADIO 18) DE *H. vertebralis*.

La figura 28A corresponde a la región lateral de un embrión del estadio de arcos branquiales, con inmunodetección contra proteínas de las miofibrillas. La reacción fue positiva en los somitas, a lo largo del cuerpo. En el mesodermo presomítico se observó menor expresión de las proteínas de las miofibrillas. En el embrión de la figura 28B se pudo observar 11 pares de somitas que expresan las proteínas de las miofibrillas que son reconocidas por el anticuerpo 12/101.

5.2.1.3 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS MIOFIBRILLAS EN EL ESTADIO DE DESARROLLO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 20 y 21) DE *H. vertebralis*.

Las figuras 29A y 29B corresponden a un embrión del estadio 20, con inmunodetección contra proteínas de las miofibrillas. En la región dorsal del embrión (Fig. 29A), se pudo observar la expresión de proteínas de las miofibrillas en los somitas, a lo largo del embrión. En la zona caudal, el mesodermo presomítico presentó reacción positiva pero en menor grado que la observada en los somitas. En la vista lateral del embrión (Fig. 29B) se observó la expresión de proteínas de las miofibrillas en 15 somitas. La expresión de proteínas musculares fue mayor en la zona dorsal en comparación con la zona ventral, de los somitas.

Las figuras 30A y 30B corresponden a un embrión del estadio 21, con inmunodetección contra las proteínas de las miofibrillas. Se observó la expresión en 20 somitas a lo largo del embrión. Se pudo observar una gradiente de expresión en sentido rostro-caudal, siendo los somitas rostrales los que presentaron mayor expresión de proteínas. En la figura 30B se observó que la expresión en los somitas más caudales es más leve. La zona dorsal de cada somita presentó mayor expresión.

5.2.2 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS MIOFIBRILLAS EN *D. auratus*.

5.2.2.1 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS MIOFIBRILLAS EN LA NÉURULA TARDÍA (ESTADIO 16) Y EL ESTADIO DE YEMA DE LA COLA (ESTADIO 17.5) DE *D. auratus*.

La figura 31 corresponde a un embrión de néurula tardía, con inmunodetección contra proteínas de las miofibrillas. En la néurula tardía se observó reacción no específica a los dos lados del tubo neural. Los somitas no fueron distinguibles.

La figura 32 corresponde a un embrión del estadio de yema de la cola, con inmunodetección con el anticuerpo 12/101. La reacción fue positiva en los 10 somitas rostrales. Se observó un gradiente de expresión en sentido rostro-caudal. Los somitas más caudales presentaron mayor expresión de las proteínas de las miofibrillas.

6. DISCUSIÓN

6.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NÉURULA DE *H. vertebralis* y *D. auratus*.

Durante la gastrulación, el mesodermo prospectivo involuciona por el labio del blastoporo, hasta que se ubica bajo el ectodermo. Después de la involución, el techo del gastrocele queda cubierto por el mesodermo prospectivo, hasta el inicio de la neurulación (Pourquié, 2001; Shook *et al.*, 2004). A medida que la neurulación avanza, las crestas laterales endodermales recubren progresivamente el mesodermo prospectivo. De esta manera el endodermo cubre el techo de la cavidad de la néurula o arquenterón (Shook *et al.*, 2004).

En la néurula temprana de *X. laevis* y *E. machalilla* el endodermo cubre el techo del arquenterón en la región rostral del embrión (Sáenz-Ponce *et al.*, 2012; Shook *et al.*, 2004). Pero en la región caudal, el recubrimiento mesodermal determina la formación de la placa del techo del gastrocele (GRP, por sus siglas en inglés). El GRP es un epitelio del mesodermo prospectivo del notocordio y los somitas, que está flanqueado a los dos lados por las crestas endodermales laterales. En *X. laevis*, el GRP es internalizado al final de la neurulación y el techo del gastrocele es recubierto por endodermo (Shook *et al.*, 2004). En *E. machalilla* el GRP se distingue a partir de la néurula temprana. Las crestas endodermales laterales cubren el GRP a medida que la néurula avanza (Sáenz-Ponce *et al.*, 2012). El GRP ha sido reportado para varias especies de ranas (Sáenz-Ponce *et al.*, 2012; Shook *et al.*, 2004). Seguramente el GRP se encuentra presente en la néurula de *H. vertebralis* y *D. auratus*. Sin embargo, la metodología usada en este estudio no permitió detectar un componente mesodermal en el techo de la cavidad intestinal de la néurula, de

ambas especies (Fig. 1; Fig. 15). Es necesario el análisis del GRP en *H. vertebralis* y *D. auratus* de la misma manera que se ha realizado para otras especies dendrobátidas, en estudios previos (Sáenz-Ponce *et al.*, 2012).

En los anfibios, la placa precordial representa al organizador de la cabeza mientras que el notocordio corresponde al organizador del tronco. La expresión de brachyury como marcador mesodermal permitió determinar la presencia del notocordio durante la gástrula media de *X. laevis* (Winklbauer y Schurfeld, 1999). Este patrón se observa en las ranas del género *Engystomops*. En *E. machalilla* y *G. riobambae*, la expresión de marcadores mesodermales del notocordio, como brachyury y lim1, se encuentra retrasada con respecto a *X. laevis*. En estas especies se observó que en la placa precordial, la expresión de brachyury y lim1 ocurre durante la gástrula. Sin embargo, en el notocordio la expresión de brachyury y lim1 se encuentra retrasada hasta el cierre del blastoporo, al finalizar la gastrulación. Lo que sugiere que en *E. machalilla* y *G. riobambae*, la elongación del notocordio ocurre después del cierre del blastoporo. Por lo tanto, en estas especies existe una separación de los organizadores de la cabeza y el tronco. (Benítez y del Pino, 2002; del Pino, 2006; del Pino *et al.*, 2007; Venegas-Ferrín *et al.*, 2010). En *E. machalilla* el notocordio se reconoce desde el estadio 13, cuando inicia la néurula. Sin embargo, el notocordio se observa totalmente formado en la néurula tardía (del Pino *et al.*, 2004). En *H. vertebralis* y *D. auratus* el notocordio se distingue en la néurula temprana. Al finalizar la neurulación, el notocordio se ha formado y alargado (Fig. 3; Fig. 18). Estas observaciones proponen un retraso en el alargamiento del notocordio en las dos ranas dendrobátidas, con respecto a *X. laevis*; como ocurre en *E. machalilla* y *G. riobambae*. Sin embargo el análisis de estadios más tempranos y de la expresión de brachyury y lim1 son requeridos para confirmarlo.

En los vertebrados el proceso de neurulación se caracteriza por la formación del tubo neural. Durante la neurulación una capa plana de células ectodermales, o placa neural, se enrolla hasta formar un tubo cilíndrico, o tubo neural (Colas y Schoenwolf, 2001; Wolpert *et al.*, 2007 wolpert; Anexo 1). Existen diferencias en el proceso de neurulación dentro de los clados de los vertebrados. Estas diferencias pueden estar relacionadas con la estrategia reproductiva de los organismos (Harrington *et al.*, 2009).

Los morfología neural observada en *H. vertebralis* y *D. auratus*, concuerda con los patrones morfológicos descritos para *X. laevis* y *E. machalilla* (del Pino *et al.*, 2004; Harrington *et al.*, 2009). En las cuatro especies de ranas, la neurulación se inicia con la formación de la placa neural, en la néurula temprana. A medida que avanza el proceso, los pliegues neurales se elevan a los extremos de la placa neural, durante la néurula media. Los pliegues neurales se acercan y forman el surco neural. Finalmente, los pliegues neurales se fusionan en la línea media y el tubo neural se cierra, en la néurula tardía.

La neurulación en *D. auratus* está ligeramente retrasada en comparación con *H. vertebralis* y *E. machalilla*. En contraste con *H. vertebralis*, en *D. auratus*, los pliegues neurales se encuentran menos elevados, durante la néurula temprana; y más separados, durante la néurula media (Fig. 15; Fig. 16). Los procesos del desarrollo, en *D. auratus*, pueden estar retrasados debido a que esta especie tiene una tasa de desarrollo más lenta que otros dendrobátidos (del Pino *et al.*, 2007). El gran tamaño del huevo de *D. auratus* puede estar influenciando la tasa del desarrollo y el proceso de neurulación.

En *X. laevis*, las células de la placa neural cambian de forma durante la neurulación. Estas células, inicialmente alargadas y en forma de cubo, adoptan una forma triangular; lo que determina la formación del surco neural (Harrington *et al.*, 2009). En *H. vertebralis* se observó que las células de la placa neural se alargan durante la néurula

temprana y mantienen esta forma hasta la néurula tardía (Fig. 1; Fig. 2; Fig. 3). En *D. auratus*, no se observa cambio en la morfología celular durante la néurula temprana o media. Sin embargo, durante la néurula tardía de *D. auratus*, las células del tubo neural tienen forma alargada, como sucede en *H. vertebralis* y *X. laevis*. Por otro lado, en las dos especies de ranas dendrobátidas se observa la compactación de células en los pliegues neurales, durante la néurula media (Fig. 2; Fig. 16). Estas observaciones sugieren que existe un proceso de intercalación celular para formar el tubo neural, al igual que ocurre en *X. laevis* (Harrington *et al.*, 2009). Sin embargo, se requiere del estudio celular de la placa neural para confirmar este proceso.

La neurulación en las dos especies de ranas dendrobátidas es similar al patrón de neurulación descrito para *E. machalilla*. Las diferencias encontradas entre *H. vertebralis* y *D. auratus* pueden responder a la velocidad del desarrollo o al tamaño del huevo. Ya que *D. auratus* presenta una tasa de desarrollo más lenta y el huevo más grande que *H. vertebralis* y *E. machalilla*. Estudios previos han reportado un retraso en la expresión de proteínas neurales de *D. auratus* (Sáenz, 2008). Estos resultados concuerdan con el retraso encontrado en algunos eventos de la neurulación de *D. auratus*; como el retraso en el levantamiento de los pliegues neurales y el alargamiento de las células de la placa neural. Sin embargo, se sugiere el análisis de la expresión de proteínas neurales en *H. vertebralis* para poder realizar un comparación más profunda.

6.2 ESTRUCTURA DE LOS EMBRIONES DE *H. vertebralis* Y *D. auratus* DESDE EL ESTADIO DE YEMA DE LA COLA (ESTADIO 17) HASTA LA ECLOSIÓN DEL RENACUAJO (ESTADIO 25).

Durante los estadios avanzados del desarrollo embrionario, la diferenciación del endodermo, mesodermo y ectodermo, determina la formación de los órganos futuros de los organismos (Wolpert *et al.*, 2007). En los embriones de *H. vertebralis* y *D. auratus* se observaron algunos de los derivados de las tres capas embrionarias. Una vez finalizada la neurulación tanto en *H. vertebralis* como en *D. auratus* se observó el intestino anterior, derivado del endodermo; los somitas y los pronefros; derivados del mesodermo. De igual manera, se identificaron algunos de los tejidos derivados del ectodermo como las vesículas cerebrales, las vesículas ópticas y óticas de los embriones. En este estudio no se analizan los derivados del endodermo en *H. vertebralis* y *D. auratus*.

Los pronefros constituyen un órgano excretor que se deriva del mesodermo y se diferencia en túbulos y el ducto pronéfrico (Asashima *et al.*, 2009). Durante la néurula temprana de *X. laevis*, se observa el primordio de los pronefros a cada lado del embrión en desarrollo. Pero el proceso de diferenciación de los pronefros se inicia en la néurula tardía. La diferenciación continúa en estadios más avanzados hasta que los túbulos pronéfricos se extienden a lo largo del embrión, en el borde ventral de los somitas (Asashima *et al.*, 2009; Drawbridge *et al.*, 2003). En *H. vertebralis* y *D. auratus* los pronefros se observan a partir de la néurula tardía, a cada lado del embrión (Fig. 3; Fig. 17). Debido a la orientación de las secciones no se observa la estructura interna de los pronefros en todos los estadios de las especies estudiadas. Sin embargo, en *H. vertebralis* y *D. auratus* se observan los túbulos pronéfricos ubicados ventralmente a los somitas, durante el estadio de yema de las branquias (Fig. 9; Fig. 21). Estas observaciones

sugieren que la diferenciación de los pronefros en *H. vertebralis* y *D. auratus* coincide con el proceso descrito para *X. laevis*. No obstante, para corroborar esta similitud se requiere de un análisis comparativo más profundo.

En los vertebrados, las células ectodermales del tubo neural se diferencian en las partes del sistema nervioso central. La región anterior del tubo neural dará origen a las partes del cerebro. La diferenciación del cerebro se inicia con la formación de tres vesículas a partir de la región rostral del tubo neural: el cerebro anterior o prosencéfalo, el cerebro medio o mesencéfalo, y el cerebro posterior o rombencéfalo. A medida que el desarrollo avanza, cada vesícula continúa diferenciándose en las estructuras cerebrales (Gilbert, 2003; Pierani y Wassef, 2009; Anexo 4). En *X. laevis*, la diferenciación inicial del cerebro empieza una vez que se ha cerrado el tubo neural, durante el inicio del estadio de yema de la cola (Youn *et al.*, 1980). Mientras que la diferenciación del cerebro en *H. vertebralis* y *D. auratus* se detecta a partir del estadio de los arcos branquiales (Fig. 8; Fig. 19). Estas observaciones sugieren que existe un retraso en la diferenciación cerebral en *H. vertebralis* y *D. auratus*, con respecto a *X. laevis*. En las ranas dendrobátidas, el retraso en la diferenciación del cerebro puede deberse a la influencia de la tasa del desarrollo.

Durante el desarrollo, el ectodermo también da origen a las vesículas ópticas y óticas del embrión. (Gilbert, 2003). Las vesículas ópticas se forman a partir de dos evaginaciones simétricas del cerebro anterior. Estas vesículas se expanden hasta entrar en contacto con el ectodermo que recubre el embrión; y se desarrollan hasta formar el ojo (Adler & Canto-Soler, 2007). En *X. laevis*, las vesículas ópticas se forman durante el estadio de yema de la cola, y entran en contacto con el ectodermo al finalizar este estadio (Grainger *et al.*, 1997). En *D. auratus* se observaron las vesículas ópticas como dos evaginaciones del cerebro anterior, durante el estadio de arcos branquiales (Fig. 19).

Debido a la orientación de las secciones, en *H. vertebralis* las vesículas ópticas se observan a partir del estadio de branquias en desarrollo. En este estadio las vesículas ópticas ya han entrado en contacto con el ectodermo que recubre al embrión (Fig. 11). En las dos especies se observa el ojo totalmente formado en el estadio de desarrollo completo de las branquias (Fig. 13; Fig. 25). Aparentemente en *H. vertebralis* y *D. auratus*, existe un retraso en la formación de las vesículas ópticas en comparación con *X. laevis*. Este retraso concuerda con la diferenciación retrasada del cerebro en las dos ranas dendrobátidas.

Muchos de los eventos de la organogénesis se encuentran conservados dentro de los vertebrados. En las ranas dendrobátidas estudiadas, la diferenciación de las capas embrionarias es similar a los eventos descritos para *X. laevis* y para otros anfibios. Sin embargo, los resultados sugieren que existen algunas diferencias en *H. vertebralis* y *D. auratus*, con respecto a *X. laevis*, como el retraso en la diferenciación del cerebro y las vesículas ópticas. Estas diferencias pueden ser el resultado de la estrategia reproductiva, la tasa de desarrollo y el tamaño del huevo. Por lo que es necesario el análisis comparativo de los eventos de organogénesis en ranas con diferentes tasas de desarrollo y tamaño de huevo.

6.3 SOMITOGÉNESIS EN *H. vertebralis* y *D. auratus*.

6.3.1 MORFOLOGÍA DE LOS SOMITAS EN *H. vertebralis* y *D. auratus*.

Los estudios en los patrones de somitogénesis y miogénesis han concluido que estos procesos no son conservados dentro de los anfibios (Radice *et al.*, 1989). En *X. laevis*, los somitas se diferencian mediante un modo de miogénesis, denominado por

rotación celular. En esta rana, el mesodermo presomítico está formado por dos capas celulares, separadas por el miocele. Inicialmente los mioblastos tienen una orientación perpendicular con respecto al tubo neural. A medida que avanza el proceso de somitogénesis, los mioblastos cambian su orientación hasta quedar paralelos al tubo neural (Hamilton, 1969; Kielbówna, 1981; Anexo 5). En contraste, en *E. machalilla* la somitogénesis es similar al patrón descrito para *B. variegata* (del Pino *et al.*, 2004; Kielbówna, 1981). La miogénesis en estas ranas ocurre por interdigitación celular (Anexo 5).

Los resultados sugieren que la somitogénesis en *H. vertebralis* y *D. auratus* coincide con el patrón descrito para *B. variegata* y *E. machalilla*. Tanto en *H. vertebralis* como en *D. auratus* las células del mesodermo presomítico tienen una forma redondeada, se encuentran desorganizadas, y no se observa miocele como sucede en *X. laevis*. En las dos especies, las células mesodermales se compactan en el lugar donde se formarán los somitas, durante la néurula media. Una vez que el mesodermo paraxial se ha segmentado en los primeros somitas, las células dentro de cada somita mantienen forma redondeada y arreglo no definido; hasta el estadio de yema de la cola. Estas células cambian de forma al finalizar el estadio de arcos branquiales. En este estadio se observan mioblastos alargados. Subsiguientemente en el estadio de yema de las branquias, los mioblastos se han alargado y se intercalan entre sí, pero no alcanzan la longitud del somita. En estadios más avanzados, una vez que se han formado las branquias, se observa que los mioblastos han alcanzado la longitud del somita y que su orientación es paralela al tubo neural. El proceso descrito para las dos ranas dendrobátidas coincide con los eventos descritos para *E. machalilla*.

La influencia de la tasa del desarrollo en el patrón de somitogénesis podría explicar la diferencia en los patrones miogénéticos encontrados entre ranas con desarrollo

rápido, como *X. laevis*; y ranas con desarrollo lento, como *E. machalilla* y *G. riobambae*. Sin embargo el estudio de la somitogénesis en ranas del género *Engystomops* contradice esta afirmación. Las especies estudiadas del género *Engystomops*, presentan una tasa de desarrollo rápido y un modo de somitogénesis por interdigitación celular, al igual que *E. machalilla* y *G. riobambae* (del Pino, 2007; Romero-Carvajal *et al.*, 2009).

Un patrón de somitogénesis similar al de *X. laevis*, ha sido encontrado en especies de la misma familia, Pipidae (Smetanick *et al.*, 1999). De igual manera, las ranas estudiadas de la familia Dendrobatidae tienen el mismo modo de somitogénesis descrito para *E. machalilla* (del Pino *et al.*, 2007). Gracias a estos resultados, se ha sugerido que la somitogénesis podría representar una relación filogenética entre especies de un mismo clado (Smetanick *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2001). No obstante, la similitud en la somitogénesis entre especies de clados lejanamente emparentados no concuerda con la relación descrita. Se desconoce la causa de la variación en los patrones de la miogénesis. Probablemente el modo de vida y la historia natural de las especies sean los responsables de esta variación (Mallo *et al.*, 2009; Radice *et al.*, 1989).

El número de somitas en cada estadio de *H. vertebralis* y *D. auratus* es igual o similar entre las dos especies, y coincide con *E. machalilla*. El número de somitas en los vertebrados es específico para cada especie (Afonin *et al.*, 2006; Pourquié, 2003). Seguramente este número está relacionado con la forma de vida de cada especie, ya que los somitas son precursores musculares y vertebrales (Mallo *et al.*, 2009; Wolpert *et al.*, 2007). La similitud en los modos de vida y las estrategias reproductivas de las ranas dendrobátidas estudiadas, son probablemente las razones por las cuales el número de somitas coincide en estas especies.

A medida que el proceso de somitogénesis avanza, los somitas empiezan a diferenciarse en esclerotoma y dermomiótoma. El dermomiótoma luego se diferencia en

dermatoma y miotoma (Mallo *et al.*, 2009; Wolpert *et al.*, 2007; Anexo 3). En las especies estudiadas existe un retraso en la diferenciación del somita con respecto a *X. laevis*. En *H. vertebralis* y *D. auratus* la diferenciación del esclerotoma y el dermomiotoma ocurre durante el estadio de yema de las branquias (Fig. 9; Fig. 21). Por otro lado, en *X. laevis* la diferenciación del esclerotoma se observa más tempranamente durante el estadio de yema de la cola (Kielbówna, 1981). El mismo patrón se observa en las ranas del género *Engystomops* (Romero, 2007). La diferenciación del somita está regulada por señales que provienen de varios tejidos adyacentes, entre los cuales están el notocordio y el tubo neural (Christ y Brand-Saberi, 2002; Fomenou *et al.*, 2005). Por lo tanto en ranas con tasas de desarrollo lento, como los dendrobátidos, la diferenciación de los somitas puede estar retrasada debido al alargamiento retardado del notocordio.

Existe una variación en los eventos morfogenéticos durante la somitogénesis, de las especies de ranas estudiadas. Algunos eventos, como la diferenciación del miotoma, pueden estar influenciados por la tasa del desarrollo. Sin embargo, las diferencias en los patrones de miogénesis pueden ser explicadas por la historia natural y el modo de vida de las especies de anfibios.

6.3.2 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MUSCULARES EN *H. vertebralis* Y *D. auratus*.

Varios autores afirman que las vías moleculares que regulan el proceso de somitogénesis son conservadas dentro de los vertebrados (Pourquié, 2003). Las proteínas musculares expresadas, durante la diferenciación de los somitas, han sido reportadas para varias especies de anfibios (del Pino *et al.*, 2007; Kintner y Brockes, 1984; Smetanick *et al.*, 2000). Sin embargo, el patrón de expresión de proteínas muestra diferencias al

comparar las especies estudiadas. En el presente estudio se analizó la expresión de proteínas musculares en las dos ranas dendrobátidas. Para esto, se realizaron inmunodetecciones con el anticuerpo monoclonal 12/101, un anticuerpo específico que reconoce las miofibrillas del músculo esquelético de los anfibios (Kintner y Brockes, 1984).

En *H. vertebralis* y *D. auratus*, la expresión de proteínas de las miofibrillas fue evidente a partir del estadio de yema de la cola (Fig. 27; Fig. 32). Durante la néurula tardía se observó una reacción positiva que podría corresponder a la expresión de estas proteínas. No obstante, esta reacción no es específica. El patrón de expresión observado en las especies analizadas, es similar al patrón descrito para *E. machalilla*. En *E. machalilla*, la expresión de proteínas musculares se detecta a partir del estadio de yema de la cola (del Pino *et al.*, 2004). En contraste en *X. laevis*, la expresión de las proteínas de las miofibrillas se ha reportado en estadios más tempranos, desde la néurula tardía (Smetanick *et al.*, 2000).

En *X. laevis* la expresión muscular se detecta en todos los somitas, en diferentes niveles; ya que forma un gradiente rostro-caudal que abarca a los somitas más caudales e incluye al mesodermo presomítico (Afonin *et al.*, 2006; Krneta-Stankic *et al.*, 2010; Standley *et al.*, 2002). Pero en *E. machalilla* los somitas más caudales y el mesodermo presomítico no expresan proteínas musculares (del Pino *et al.*, 2004). De igual manera, este patrón se observó en *H. vertebralis* y *D. auratus*. En estas especies la expresión muscular forma un gradiente rostro-caudal, pero los niveles de expresión en los somitas más caudales y el mesodermo presomítico son indetectables. Los resultados obtenidos para *E. machalilla*, *H. vertebralis* y *D. auratus* pueden deberse a que la expresión de proteínas musculares, en los somitas caudales, está por debajo del umbral detectado por la

técnica de inmunodetección. Sin embargo, es posible que en las ranas dendrobátidas, la especificación muscular en los somitas tarde más tiempo, en contraste con *X. laevis*.

Krneta-Stankic *et al.*, 2010, sugieren que los movimientos de convergencia y extensión dorsales influyen en la distribución futura de las fibras del miotoma, ya que determinan la especificación de los tejidos del mesodermo. En *E. machalilla* existe un retraso en los movimientos de convergencia y extensión dorsales, lo que lleva a un retraso en la elongación del notocordio. En esta especie se ha relacionado el patrón de expresión muscular con el retraso en los movimientos de convergencia y extensión dorsales (del Pino *et al.*, 2007). Se desconoce la existencia de un retraso en la convergencia y extensión dorsales en *H. vertebralis* y *D. auratus*. Pero los eventos en la formación del notocordio, la neurulación y la somitogénesis son similares en las especies de ranas dendrobátidas estudiadas. Por lo cual es probable que exista un retraso en la convergencia y extensión dorsales en *H. vertebralis* y *D. auratus*. Este retraso puede ser la causa del patrón de expresión de proteínas musculares en *H. vertebralis* y *D. auratus*. Por lo tanto el alargamiento retardado del notocordio también puede estar involucrado; ya que las señales que provienen del notocordio y del tubo neural mantienen la expresión de proteínas en el miotoma (Christ y Brand-Saberi, 2002).

Las diferencias en la expresión muscular pueden corresponder a las diferentes estrategias reproductivas de los anfibios estudiados. Los embriones de *X. laevis* se desarrollan en el agua, sin cuidado parental. En esta especie el desarrollo es rápido y probablemente el desarrollo acelerado del linaje muscular responda a presiones selectivas como la depredación. Por otro lado, en *E. machalilla*, *H. vertebralis* y *D. auratus*, el desarrollo puede estar retrasado ya que son especies con cuidado parental. En estas especies, no existe la necesidad de acelerar la especificación del linaje muscular porque el cuidado parental reduce la presión selectiva que efectúa la depredación.

En este estudio se encontró que los procesos de neurulación y somitogénesis de *H. vertebralis* y *D. auratus* corresponden a los patrones descritos para varias especies de la familia Dendrobatidae. Por el contrario, estos eventos en las ranas dendrobátidas difieren de los patrones descritos para *X. laevis*. Muchos autores sugieren que las variaciones en la miogénesis pueden ser resultado de constricciones históricas dentro de los linajes. Pero hasta el momento, esta relación no ha sido comprobada (Fan *et al.*, 2001; Radice *et al.*, 1989). Por otro lado, es probable que exista un efecto de la estrategia reproductiva y la tasa del desarrollo, en al menos algunos de los eventos de neurulación y somitogénesis (Radice *et al.*, 1989). Muchos autores sostienen que el proceso de somitogénesis puede estar ligado al modo de vida y la historia natural de las especies (Fan *et al.*, 2001). La larga historia filogenética de los anfibios habría permitido la diversidad de diversos programas del desarrollo (Elinson y del Pino, 2012). Por esta razón, el estudio comparativo del desarrollo permite transparentar la variación en los eventos y el motivo de esta variación.

7. LITERATURA CITADA

Adler, R. y Canto-Soler, M. V. Molecular mechanisms of optic vesicle development: Complexities, ambiguities and controversies. *Developmental Biology* 305: 1-13.

Afonin, B., Ho, M., Gustin, J.K., Meloty-Kapella, C. y Domingo, C.R. 2006. Cell Behaviors Associated With Somite Segmentation and Rotation in *Xenopus laevis*. *Developmental Dynamics* 235: 3268-3279.

Asashima, M., Ito, Y., Chan, T., Michue, T., Nakanishi, M., Suzuki, K., Hitachi, K., Okabayashi, K., Kondow, A. y Ariizumi, T. 2009. In Vitro Organogenesis from Undifferentiated Cells in *Xenopus*. *Developmental Dynamics*. 238:1309–1320.

Benítez, M.S. y del Pino, E.M. 2002. The expression of Brachyury during development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *Developmental Dynamics* 225: 592–596.

Brustis, J.J. 1979. Aspects ultrastructuraux de l'organisation et de la differenciation précoce des myotomes chez l'embryon du crapaud commun *Bufo bufo*. *Archives De Biologie* 90: 261-272.

Christ, B. y Brand-Saberi, B. 2002. Limb muscle development. *International Journal of Developmental Biology* 46: 905-914.

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

Coloma, L. A., Ron, S., Morales, M. y Almendáriz, A. 2004. *Hyloxalus vertebralis*.

IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2.

<http://www.iucnredlist.org>. Accedido: Enero, 16 de 2011.

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

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

del Pino, E. M. y Medina, A. 1998. Neural Development in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. *International Journal of Developmental Biology* 42: 723-731.

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

Elinson, R. P. y del Pino, E. M. 2012. Developmental diversity of amphibians. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology 1:345–369. doi: 10.1002/wdev.23.

Fan, S.Y., De Sá, R.O. y Radice, G.P. 2001. A Common Pattern of Somite Cell Rotation in Three Species of Pipidae. Journal of Herpetology 35: 114-116.

Fomenou, M.D., Scaal, M., Stockdale, F.E., Christ, B. y Huang, R. 2005. Cells of All Somitic Compartments Are Determined With Respect to Segmental Identity. Developmental Dynamics 233: 1386-1393.

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

Gilbert, S.F. 2003. Developmental Biology. Seventh Edición. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, U.S.A.

Giudicelli, F., Özbudak, E.M., Wright, G.J. y Lewis, J. 2007. Setting the Tempo in Development: An Investigation of the Zebrafish Somite Clock Mechanism. PLoS Biology 5: 1309-1323.

Grainger, R. M., Mannion, J. E., Cook, T. L. y Zygar, C. A. 1997. Defining Intermediate Stages in Cell Determination: Acquisition of a Lens-Forming Bias in Head Ectoderm During Lens Determination. Developmental Genetics 20:246–257.

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

Hamilton, L. 1969. The formation of somites in *Xenopus*. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 22: 253-264.

Harrington, M.J., Hong, E. y Brewster, R. 2009. Comparative Analysis of Neurulation: First Impressions Do Not Count. *Molecular Reproduction & Development* 76: 954-965.

Kielbówna, L. 1981. The formation of somites and early myotomal myogenesis in *Xenopus laevis*, *Bombina variegata* and *Pelobates fuscus*. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 64: 295-304.

Kintner, C. y Brockes, J. 1985. Monoclonal antibodies to the cells of a regenerating limb. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 89: 37-55.

Kispert, A., y Herrmann, B. G. 1994. Immunohistochemical analysis of the Brachyury protein in wild type and mutant mouse embryos. *Developmental Biology* 161: 179-193.

Kondow, A., Hitachi, K., Ikegame, T. y Asashima, M. 2006. Bowline, a novel protein localized to the presomitic mesoderm, interacts with Groucho/TLE in *Xenopus*. *International Journal of Developmental Biology* 50: 473-479.

Krneta-Stankic, V., Sabillo, A. y Domingo, C.R. 2010. Temporal and Spatial Patterning of Axial Myotome Fibers in *Xenopus laevis*. *Developmental Dynamics* 239: 1162-1177.

Kuratani, S. y Horigome, N. 2000. Developmental morphology of branchiomic nerves in a cat shark *Scyliorhinus torazame* with special referent to rhombomeres, cephalic mesoderm and distribution patterns of cephalic crest cells. *Zoological Science* 17: 893-909.

Mallo, M., Vinagre, T. y Carapuço, M. 2009. The road to the vertebral formula. *International Journal of Developmental Biology* 53: 1469-1481.

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

Pierani, A. y Wassef, M. 2009. Cerebral cortex development: From progenitors patterning to neocortical size during evolution. *Development, Growth & Differentiation* 51: 325–342.

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

Pourquié, O. 2003. Vertebrate somitogenesis: a novel paradigm for animal segmentation?. *International Journal of Developmental Biology* 47: 597-603.

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

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

Romero, M.A. 2007. Desarrollo temprano y Somitogénesis en dos especies del género *Engystomops* (Anura: Leiuperidae). Disertación de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

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

Sáenz, A.N. 2008. Neurulación en cinco especies de ranas (*Engystomops*, *Dendrobates*, *Ameerga* y *Epipedobates*). Disertación de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

Shin, Y., Kitayama, A., Koide, T., Peiffer, D.A., Mochii, M., Liao, A., Ueno, N. y Cho, K.W.Y. 2005. Identification of Neural Genes Using *Xenopus* DNA Microarrays. *Developmental Dynamics* 232: 432-444.

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

Smetanick, M.T, De Sá, R.O. y Radice, G.P. 2000. Do Timing and Pattern of Myogenesis Correlate with Life History Mode in Anurans?. *Journal of Herpetology* 34: 637-642.

Smetanick, M.T., De Sá, R.O. y Radice, G.P. 1999. The Timing and Pattern of Myogenesis in *Hymenochirus boettgeri*. *Journal of Herpetology* 33: 330-334.

Solís, F., Ibáñez, R., Jaramillo, C., Chaves, G., Savage, J., Köhler, G., Jungfer, K.H. y Bolívar, W. 2004. *Dendrobates auratus*. IUCN 2007. IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org>. Accedido: Enero, 16 de 2011.

Standley, H., Zorn, A. y Gurdon, J. 2002. A dynamic requirement for community interactions during *Xenopus* myogenesis. *International Journal of Developmental Biology* 46: 279-283.

Takahashi, Y. 2005. Common mechanisms for boundary formation in somitogenesis and brain development: shaping the 'chic' chick. *International Journal of Developmental Biology* 49: 221-230.

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. *International Journal of Developmental Biology* 54: 195-202.

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

Wolpert, L., Jessel, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., y Smith, J. 2007. Principles of Development. Tercera ed. Oxford University Press, USA.

Yan, B., Neilson, K.M. y Moody, S.A. 2010. Microarray Identification of Novel Downstream Targets of FoxD4L1/D5, a Critical Component of the Neural Ectodermal Transcriptional Network. *Developmental Dynamics* 239: 3467-3480.

Youn, B.W. y Malacinski, G.M. 1981. Comparative analysis of amphibian somite morphogenesis: cell rearrangement patterns during rosette formation and myoblast fusion. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 66: 1-26.

Youn, B.W., Keller, R.E. y Malacinski, G.M. 1980. An atlas of notochord and somite morphogenesis in several anuran and urodelean amphibians. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 59: 223-24.

8. FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

a:	Arquenterón	it:	Intestino
ab:	Arcos branquiales	mp:	Mesodermo presomítico
aba:	Arco branquial anterior	mt:	Miotoma
abp:	Arco branquial posterior	n:	Notocordio
ac:	Aleta de la cola	ne:	Neuroectodermo
ad:	Aleta dorsal	o:	Ojo
adr:	Aorta dorsal	pf:	Pronefros
ah:	Arco hiodeo	pln:	Pliegues neurales
am:	Arco mandibular	pn:	Placa neural
bp:	Blastoporo	rb:	Rama de las branquias
br:	Branquias	ra:	Rama anterior de las branquias
ca:	Cerebro anterior	rp:	Rama posterior de las branquias
cm:	Cerebro medio	s:	Somita
cn:	Cresta neural craneal	sc:	Esclerotoma
cp:	Cerebro posterior	sn:	Surco neural
dm:	Dermomiotoma	so:	Estomodeo
e:	Endodermo	tn:	Tubo neural
ec:	Ectodermo	vo:	Vesícula óptica
ep:	Epidermis	vot:	Vesícula ótica
fa:	Faringe	y:	Yema
if:	Infundíbulo	yb:	Yema de las branquias
		yc:	Yema de la cola