

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Descripción morfológica de los embriones de *Hyloxalus nexipus* (Anura: Dendrobatidae)
desde el clivaje hasta la eclosión del renacuajo.

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

JENIFER DAYANA CONTRERAS CISNEROS

Quito, 2015

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Jenifer Dayana Contreras Cisneros ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Andrés Romero-Carvajal

Director de la Disertación

Quito, 23 de noviembre del 2015

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por todo el apoyo que me han brindado durante toda mi vida, por su amor incondicional, por ser mi ejemplo, mis guías y mi fortaleza. A mis hermanas por estar junto a mí en cada paso.

Agradezco a la Doctora Eugenia del Pino, por su guía profesional durante el desarrollo de este trabajo; además por su preocupación y su apertura ante las inquietudes que surgieron a lo largo de la elaboración de la disertación. Al Doctor Andrés Romero-Carvajal por su guía durante el análisis de los resultados de este trabajo y la escritura del mismo.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por las becas de investigación otorgadas al laboratorio de Biología del Desarrollo. Al Centro de Investigación y Conservación de Anfibios (CICA) y a la Iniciativa de Conservación “Balsa de los Sapos”, por la donación de los embriones utilizados en este estudio.

A los integrantes del Laboratorio de Biología del Desarrollo, por su ayuda y amistad. A Alex, Anita Belén y Franco. En especial a María José por su ayuda y colaboración en la realización de este trabajo.

A David, muchas gracias por tu cariño, tu apoyo y por tu paciencia. A Ana Belén, Sarah, Mishell, Carolina, Christian y Nicolás, por hacer de mi vida universitaria una experiencia maravillosa, gracias por todo su apoyo y compañía. Finalmente, a toda mi familia y amigos que han estado conmigo en todo momento y a todos quienes han formado parte de mi vida.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN	13
2.	ABSTRACT	14
3.	INTRODUCCIÓN.....	15
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1	OBTENCIÓN Y CULTIVO DE EMBRIONES.....	21
4.2	PROCESAMIENTO Y FIJACIÓN DE LOS EMBRIONES.....	21
4.2.1	SOLUCIONES Y FIJATIVOS	21
4.2.1.1	SOLUCIÓN DE STEINBERG.....	21
4.2.1.2	PBS (TAMPÓN DE FOSFATO SALINO).....	22
4.2.1.3	FORMALINA 10 %	22
4.2.1.4	FIJATIVO SMITH	22
4.2.1.4.1	SOLUCIÓN A	22
4.2.1.4.2	SOLUCIÓN B.....	22
4.2.1.5	FIJATIVO MEMFA	23
4.2.2	PROCESAMIENTO DE LOS EMBRIONES	23
4.2.3	FIJACIÓN DE EMBRIONES.....	24
4.2.3.1	FIJACIÓN CON SMITH	24
4.2.3.2	FIJACIÓN CON MEMFA.....	24

4.3 OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LOS EMBRIONES.....	25
4.3.1 BISECCIONES	25
4.3.2 SECCIONES DE VIBRATOMO	25
4.4 FOTOGRAFÍA DE EMBRIONES ENTEROS Y SECCIONES	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1 EL DESARROLLO TEMPRANO DE <i>H. nexipus</i> :	27
5.2 LA EXPANSIÓN DEL BLASTOCELE OCURRE DURANTE LA BLÁSTULA MEDIA EN <i>H. nexipus</i>	28
5.2.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA BLÁSTULA DE CÉLULAS GRANDES, CÉLULAS MEDIANAS Y CÉLULAS PEQUEÑAS (ESTADIO 7, 8 Y 9)	28
5.3 EL ARQUENTERÓN DE <i>H. nexipus</i> SE ELONGA EN LA GÁSTRULA TARDÍA... 29	
5.3.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA – LABIO DORSAL DEL BLASTOPORO (ESTADIO 10).....	29
5.3.2 MORFOLOGIA Y ESTRUCTUTA INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA – TAPÓN DE YEMA GRANDE (ESTADIO 11).....	30
5.3.3 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA MEDIA-TAPÓN DE YEMA MEDIANO (ESTADIO 12).....	30
5.3.4 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TARDÍA - TAPÓN DE YEMA PEQUEÑO (ESTADIO 12.5).....	31

5.3.5 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA POST- GÁSTRULA (ESTADIO 13.5).....	31
5.4 EL RECUBRIMIENTO ENDODERMAL DEL NOTOCORDIO DE <i>H. nexipus</i> OCURRE DURANTE LA NEURULA.	32
5.4.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA POST- GÁSTRULA (ESTADIO 13.5).....	32
5.4.2 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NEURULA (ESTADIOS 14, 15, 16).	33
5.5 LA FORMACIÓN DE LA YEMA DE LAS BRANQUIAS EN <i>H. nexipus</i> COMIENZA EN EL ESTADIO 19 Y LA RAMIFICACIÓN DE LAS BRANQUIAS EN EL ESTADIO 20.	34
5.5.1 MORFOLOGIA DEL ESTADIO DE YEMA DE LA COLA, ESTADIO DE RESPUESTA MUSCULAR Y ESTADIO DE YEMA DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 17, 18 Y 19).	34
5.5.2 MORFOLOGIA DE LOS ESTADIOS DE DESARROLLO DE BRANQUIAS (ESTADIOS 20, 21, 23).	35
6. DISCUSIÓN.....	36
6.1 EN DENDROBÁTIDOS, LA ESTRATEGIA REPRODUCTIVA TERRESTRE NO ESTÁ RELACIONADA CON LOS DIÁMETROS DEL HUEVO Y EL TIEMPO DEL DESARROLLO.....	37
6.2 LOS BLASTÓMEROS ANIMALES DE <i>H. nexipus</i> POSEEN PIGMENTO CELULAR AL IGUAL QUE <i>X. laevis</i>	39

6.3 ¿QUÉ INFLUYE EN EL PATRÓN DE GASTRULACIÓN: FILOGENIA O ESTRATEGIA REPRODUCTIVA?	40
6.4 LA NEURULACIÓN DE <i>H. nexipus</i> SIGUE EL PATRÓN DE DESARROLLO DE ANFIBIOS.....	45
6.5 <i>Hyloxalus nexipus</i> TIENE UN DESARROLLO AVANZADO SIMILAR A <i>H. vertebralis</i> Y OTROS DENDROBÁTIDOS.	47
6.6 LA RAMIFICACIÓN DE LAS BRANQUIAS ES DIFERENTE PARA CADA ESPECIE DE DENDROBÁTIDO ANALIZADO.	48
6.7 EL DESARROLLO TEMPRANO EN LOS DENDROBÁTIDOS SIGUE UN PATRÓN GENERAL.	50
7. LITERATURA CITADA	51
8. FIGURAS	58
9. TABLAS.....	69
10. ANEXOS	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Expansión del blastocele en la blástula media. Morfología de los estadios de blástula de células grandes, medianas y pequeñas de *H. nexipus* (estadios 7, 8 y 9)..... 59
- Figura 2. El arquenterón de *H. nexipus* se expande en la gástrula tardía. Morfología de la gástrula temprana, media, tardía y post-gástrula de *H. nexipus* (Estadios 10, 11, 12, 12.5, 13.5)..... 61
- Figura 3. El recubrimiento endodermal del Notocordio ocurre durante la Néurula. Morfología de los estadios de post-gástrula, néurula temprana, media y tardía de *H. nexipus* (Estadios 13, 14, 15, 16)... 63
- Figura 4. La formación de la yema de las branquias en *H. nexipus* comienza en el estadio 19. Morfología del estadio de yema de la cola, estadio de respuesta muscular y estadio de yema de las branquias de *H. nexipus* (Estadio 17, 18, 19):..... 65
- Figura 5. La ramificación de las branquias comienza en el estadio 20. Morfología de embriones en estadios de desarrollo de branquias de *H. nexipus* (Estadios 20, 21, 23)..... 67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diámetro de los embriones de <i>Hyloxalus nexipus</i>	70
Tabla 2. Tabla del desarrollo, en horas y minutos, de los embriones de <i>H. nexipus</i>	71
Tabla 3. Tabla de tiempos de gastrulación, en horas y minutos, de los embriones de <i>H. nexipus</i>	72

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Tabla de posturas obtenidas de <i>Hyloxalus nexipus</i>	74
Anexo 2. Tabla del desarrollo de <i>Hyloxalus nexipus</i>	75
Anexo 3. Los tiempos de gastrulación son variables entre especies de la familia Dendrobatidae.....	77
Anexo 4. Tabla de estrategias reproductivas, tamaño de huevo y tiempo de gastrulación de diferentes familias de ranas.....	78
Anexo 5. Patrones de Gastrulación en ranas.....	79
Anexo 6: Filogenia de la familia Dendrobatidae.....	81
Anexo 7. Comparación de las ramificaciones de las branquias en el estadio de máximo desarrollo de branquias en 5 especies de Dendrobatidos	83
Anexo 8. Lista de Fotografías y Créditos.....	84

1. RESUMEN

En este estudio se describe y analiza el desarrollo temprano, desde el clivaje hasta la eclosión del renacuajo, de *Hyloxalus nexipus* (Anura: Dendrobatidae). Además, se compara el desarrollo embrionario de esta especie con otras especies de dendrobátidos para poder proponer un patrón general del desarrollo para esta familia. *Hyloxalus nexipus*, al igual que otras especies de dendrobátidos, presenta una estrategia reproductiva terrestre. Estas ranas depositan huevos de aproximadamente 2.5 mm de diámetro, sobre la hojarasca cerca de riachuelos y poseen cuidado parental durante su desarrollo temprano. Su desarrollo tarda aproximadamente 16 días desde la blástula temprana hasta la eclosión. El desarrollo de esta especie fue dividido en 25 estadios de acuerdo a la tabla del desarrollo descrita para *Epipedobates machalilla*. La morfología de los embriones fue evaluada en montajes enteros, bisecciones y secciones de vibratomo. La blástula, gástrula, néurula y estadios avanzados son muy similares morfológicamente a otras especies de dendrobátidos. Sin embargo, los dendrobátidos presentan algunas diferencias entre sí, como la diferencia en los diámetros de huevos, la variación en la temporalidad de la gastrulación y la diferencia en la ramificación de las branquias. A pesar de tener estas diferencias, los dendrobátidos poseen un mismo patrón del desarrollo. Este patrón podría estar relacionado a la estrategia reproductiva que presenta esta familia, o a caracteres que han sido conservados en la historia filogenética de los dendrobátidos.

Palabras claves: Desarrollo temprano, Dendrobátidos, Estrategias reproductivas, *Hyloxalus nexipus*, Patrones de gastrulación, Temporalidad del desarrollo.

2. ABSTRACT

This study describes and analyzes the early development, from cleavage to tadpole hatching of *Hyloxalus nexipus* (Anura: Dendrobatidae). Also, it compares the embryonic development of these species with other species of dendrobatids to propose a general pattern of development for this family. *Hyloxalus nexipus*, like other dendrobatids, has terrestrial eggs. They lay their eggs of approximately 2.5 mm in diameter on the leaf-litter near streams, and have parental care during their early development. Development takes about 16 days from early blastula to hatching. The development of this species was divided into 25 stages, according to the table described for the development of *Epipedobates machalilla*. Embryo morphology was evaluated in whole mount, bisections and vibratome sections. The blastula, gastrula, neurula, and advanced stages, are morphologically similar to other species of dendrobatids. However, dendrobatids have some differences between them, such as egg diameter, gastrulation time, and embryonic gills. Despite having these differences, dendrobatids have the same pattern of development. This pattern may be related to the reproductive strategy of this family, or characters that have been preserved through the phylogenetic history of dendrobatids.

Key words: Dendrobatids, Early development, Gastrulation patterns, *Hyloxalus nexipus*, Reproductive strategies.

3. INTRODUCCIÓN

Los anuros, debido a la sencilla y rápida obtención de embriones fertilizados, además de la fácil manipulación de los embriones y su alta resistencia ante microcirugías, han sido uno de los organismos utilizados en el estudio de la Biología del Desarrollo (Revisado en Kay y Peng, 1991; Wolpert, 2007). La rana *Xenopus laevis* es el organismo modelo del desarrollo en anfibios (Wolpert, 2007) y ha sido utilizado ampliamente en gran variedad de estudios de embriología. Sin embargo, el estudio del desarrollo embrionario de otras especies de anuros ha permitido observar que existen diferencias en algunas etapas del desarrollo temprano de estas ranas (del Pino *et al.*, 2007). Por esta razón, en este trabajo se utilizará a *Hyloxalus nexipus*, miembro de la familia Dendrobatidae, como organismo de estudio. Esta especie, al ser un dendrobátido, se espera que siga el patrón de desarrollo temprano descrito para otras especies pertenecientes a la misma familia. El conocimiento del desarrollo embrionario de esta especie permite proponer un patrón del desarrollo para dendrobátidos.

El desarrollo temprano de los anuros comienza con la fertilización del huevo, seguido por los procesos de clivaje, la gastrulación, la neurulación y la organogénesis. Durante el clivaje, el huevo comienza a dividirse en células cada vez más pequeñas (Revisado en Wolpert, 2007). La primera división del clivaje usualmente comienza en el hemisferio animal, que se encuentra pigmentado en algunas especies de ranas como los dendrobátidos (Desnitskiy, 2011). La división celular ocurre de tal manera que las células que se encuentran en el hemisferio animal (blastómeros animales) van a ser más pequeñas en comparación a las células del hemisferio vegetal (blastómeros vegetales). Al interior del hemisferio animal se

encuentra una cavidad llamada blastocele. En este estadio, el embrión se denomina blástula (Wolpert, 2007). La gastrulación es una etapa de reordenamiento celular (Symes y Smith, 1987). Durante la gastrulación ocurren una serie de movimientos celulares: rotación vegetal, involución celular, epibole y convergencia y extensión dorsal (Wolpert, 2007). En ranas, la gastrulación tiene dos objetivos principales que son: el cerramiento del blastoporo que permite la ingresión del endodermo y el mesodermo y la formación del arquenteron (Ewald *et al.*, 2004). Posteriormente, la neurulación inicia con la formación de la placa neural. Los pliegues neurales se elevan alrededor de la placa neural y se acercan dando origen al surco neural, durante la neúrcula media. Al finalizar la neurulación, en la neúrcula tardía, los pliegues se unen en la línea media y el tubo neural se cierra (Nieuwkoop y Faber, 1994). En los estadios posteriores a la neúrcula, se puede observar la formación de la cabeza, de los arcos branquiales, el desarrollo de la cola y la externalización de las branquias.

Los anfibios, poseen branquias externas en la fase larvaria, estas branquias se originan en los extremos de los primeros arcos branquiales (Parker y Haswell, 1987). Las branquias externas están relacionadas con el intercambio de oxígeno y la respiración en los embriones antes de la eclosión, ya que les proporciona una superficie más extensa, flexible y focalizada para el intercambio gaseoso (Warkentin, 2002). Las branquias externas se retraen antes de la eclosión en algunas especies de ranas que se encuentran expuestas a altas concentraciones de oxígeno, en contraste, con otras especies que eclosionan con branquias, debido a que su ambiente es pobre en oxígeno (Warkentin, 2000). La longitud de las branquias externas varía entre las diferentes especies de anuros. En algunas especies son cortas y simples, sin embargo, en otras especies de ranas son largas y elaboradas como en algunas especies del género *Agalychnis* (Warkentin, 2000).

A pesar de que las etapas del desarrollo son altamente conservadas entre especies (Pourquié, 2003), existen diferencias fundamentales en el desarrollo temprano de los anuros (Elinson y del Pino, 2012). Las variaciones en las etapas del desarrollo pueden ser la respuesta a la extensa historia filogenética que presenta este grupo de anfibios o a las diferentes adaptaciones reproductivas a que tienen las diferentes especies de ranas (Elinson y del Pino, 2012). La estrategia reproductiva acuática es el modo reproductivo más basal (Gomez-Mestre *et al.*, 2012) y está presente en la mayoría de especies de anuros incluyendo a *X. laevis*. Los individuos que poseen esta estrategia se desarrollan totalmente en el agua, desde la ovoposición hasta la metamorfosis (Duellman y Trueb, 1986). Una variación de esta estrategia es la que presentan las ranas del género *Engystomops*. Estas ranas depositan sus huevos en nidos de espuma que se encuentran flotando sobre el agua, lo que evita la desecación y la predación de los embriones (Duellman y Trueb, 1986). En estas especies, el patrón de gastrulación es rápido, la involución ocurre durante la gástrula temprana y la elongación del arquenterón y el notocordio ocurren simultáneamente durante la gástrula media, antes del cierre del blastoporo (del Pino *et al.*, 2007; Romero-Carvajal *et al.*, 2009). En comparación existen las ranas que tienen reproducción terrestre como los miembros de la familia Dendrobatidae. Estas ranas depositan sus huevos sobre la hojarasca. Después del amplexus, la hembra deja el nido, mientras que el macho se queda a cuidar los huevos hasta que son renacuajos. Posteriormente, el macho coloca los renacuajos en su espalda y los lleva hasta un riachuelo donde pueden continuar su etapa acuática, lo que demuestra además una estrategia de cuidado parental por parte del macho (Duellman y Trueb, 1986; Haddad y Prado, 2005). Esta estrategia presenta ciertas características como un menor número de huevos, huevos de mayor diámetro, adultos más pequeños y el cuidado parental por parte de uno de los padres (Gomez - Mestre *et al.*, 2012). En esta familia, el patrón de gastrulación es lento, la

elongación del arquenterón ocurre simultáneamente a la involución celular y la elongación del notocordio ocurre después del cierre del blastoporo. Como resultado del retraso en la convergencia y extensión dorsal, las células que involucionan por el labio dorsal del blastoporo se acumulan y forman un collar circumblastoporal (del Pino *et al.*, 2004). Otro tipo de estrategia reproductiva es la de *Gastrotheca riobambae*. Estas ranas colocan sus huevos dentro de un marsupio ubicado en el dorso de la rana, lo que le proporciona al embrión otro ambiente diferente al agua (del Pino y Looor- Vela, 1990). El patrón de gastrulación de *G. riobambae* es más lento que en los dendrobatidos. En esta especie, la involución ocurre durante todo el proceso de gastrulación y la elongación del arquenterón y el notocordio ocurren en la postgástrula, después de cerrado el blastoporo. Este retardo forma una acumulación de células alrededor del blastoporo denominado disco embrionario (del Pino *et al.*, 2007). La estrategia reproductiva más derivada es la estrategia de las familias Brachycephalidae, Ceuthomantidae, Craugastoridae, Eleutherodactylidae, y Strabomantidae, miembros del clado Terrarana. Las especies de este clado tienen un desarrollo embrionario directo, es decir no tienen etapa de renacuajos (Heinicke *et al.*, 2009).

Las diferencias encontradas en la modularidad de la gástrula, se evidencia en ranas con diferentes estrategias reproductivas (Elinson y del Pino, 2012). Estas diferencias se pueden corroborar mediante estudios moleculares. En los anfibios, se ha demostrado que existen dos organizadores, la placa precordial como organizador de la cabeza y el notocordio como organizador del tronco (Revisado en Elinson y del Pino, 2012). Esto se pudo comprobar por la presencia de dos marcadores mesodermales *Brachyury* y *Lim1* (Benítez y del Pino, 2002; del Pino *et al.*, 2007; Venegas-Ferrín *et al.*, 2010). El gen *Brachyury* se encuentra alrededor del blastoporo y en el notocordio (Smith *et al.*, 1991) y el gen *Lim1* se encuentra en la placa

precordial y el notocordio (Taira *et al.*, 1992). En *Epipedobates machalilla* durante la gástrula media *Lim1* se encuentra restringida en la placa precordial y *Brachyury* alrededor del tapón de yema en el collar circumblastoporal (Venegas-Ferrín *et al.*, 2010). Únicamente al finalizar la gastrulación, estos dos marcadores se expresan en el notocordio, cuando la convergencia y extensión dorsal permite la elongación del notocordio (Revisado en Elinson y del Pino, 2012; Venegas-Ferrín *et al.*, 2010). En la rana *X. laevis*, los dos marcadores se expresan en los dos organizadores desde la gástrula media (Venegas-Ferrín *et al.*, 2010). El retraso en la expresión de estos marcadores en los dendrobatidos demuestra claramente la diferencia en la modularidad de este proceso entre estas ranas y la rana modelo *X. laevis* (Benítez y del Pino, 2002; Venegas-Ferrín *et al.*, 2010).

Hyloxalus nexipus es miembro de la familia Dendrobatidae. Los individuos de esta especie depositan sus huevos sobre la tierra y son llevados por sus padres a los riachuelos cuando son renacuajos. Es por esta razón que esta especie está restringida a hábitats cerca de ríos y riachuelos. Esta especie se distribuye en las estribaciones bajas de la Cordillera Oriental de los Andes desde el Norte del Perú en la región de Yurimaguas, hasta el sureste del Ecuador, en la provincia de Morona Santiago, desde los 500 hasta los 1500 metros sobre el nivel del mar (Coloma, 1995). La oportunidad de estudiar esta especie de dendrobatidos es de gran importancia porque, con la descripción del desarrollo embrionario de otra especie de esta familia, es posible proponer un patrón general del desarrollo embrionario para esta la familia.

Este estudio tiene como objetivo describir la morfología externa e interna y el tiempo de desarrollo de los embriones de *Hyloxalus nexipus* (Anura: Dendrobatidae) desde el clivaje hasta la eclosión del renacuajo, para poder comparar el desarrollo temprano de esta especie con otras especies de dendrobátidos antes estudiadas y poder proponer un patrón general del

desarrollo embrionario en esta familia de anuros. Este trabajo contribuye con los análisis comparativos que se realizan en el laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE y aportará como futura herramienta para posteriores estudios con Dendrobátidos

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE EMBRIONES

Los embriones de *Hyloxalus nexipus* provinieron de posturas donadas por la Iniciativa de conservación “Balsa de los Sapos” de la Pontificia Universidad Católica. Los especímenes parentales provienen de la Provincia de Morona Santiago. En el laboratorio, los embriones fueron colocados dentro de cámaras húmedas, realizadas con cajas Petri de cristal pequeñas y papel absorbente humedecido con agua destilada. Sobre esta cama de papel se coloca pedazos de plástico, y sobre estos se incuban los embriones para que continúen su desarrollo. Las cámaras húmedas se conservaron a la temperatura ambiente de Quito (18 - 24°C).

4.2 PROCESAMIENTO Y FIJACIÓN DE LOS EMBRIONES

4.2.1 SOLUCIONES Y FIJATIVOS

4.2.1.1 SOLUCIÓN DE STEINBERG (Rugh, 1962)

- 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 KH₂PO₄
- 7 mM Na₂HPO₄
- 137.7 mM NaCl

4.2.1.3 FORMALINA 10 %

- 10% formaldehído (Formalina)
- Agua destilada.

4.2.1.4 FIJATIVO SMITH

4.2.1.4.1 SOLUCIÓN A

- 0.035M dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) en 1 litro de agua destilada.

4.2.1.4.2 SOLUCIÓN B

- 20% formalina

- 5% de ácido acético
- Agua destilada

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

4.2.1.5 FIJATIVO MEMFA

- 0.1 M MOPS pH 7.4
- 5 mM EDTA
- 1mM MgSO₄
- 3.7% Formaldehído.

4.2.2 PROCESAMIENTO DE LOS EMBRIONES

Los embriones fueron manipulados y observados en una solución de Steinberg al 0.15% (Ver sección 4.2.1.1). Para la observación de los embriones, se utilizó el estereomicroscopio WILD Heerbrugg e iluminación con lámparas de fibra óptica KL 1500 (Zeiss).

Para determinar los estadios del desarrollo de *H. nexipus* se usó a la tabla del desarrollo descrita para *Epipedobates machalilla* (del Pino *et al.*, 2004).

4.2.3 FIJACIÓN DE EMBRIONES

Los embriones fueron fijados de acuerdo a los métodos descritos para *Epipedobates machalilla* (del Pino *et al.*, 2004). Se usaron pinzas finas para retirar las capas de gelatina. Los embriones fueron fijados en Smith's (Ver sección 4.2.1.4) o MEMFA (Ver sección 4.2.1.5) de la manera que se describe a continuación.

4.2.3.1 FIJACIÓN CON SMITH

Los embriones, sin capas de gelatina, fueron fijados durante 24 horas en el fijativo Smith (Ver sección 4.2.1.4) a temperatura ambiente y en la oscuridad. A continuación, los embriones fueron lavados con agua destilada para eliminar el fijativo. Finalmente, los embriones fueron almacenados en una solución 2:3 de formalina 10% (Ver sección 4.2.1.3) y PBS 1X (Ver sección 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 (Ver sección 4.2.1.5) durante 2 horas y 30 minutos, a temperatura ambiente. Luego, los embriones

fueron transferidos progresivamente a metanol al 100% y almacenados a -20°C en tubos Eppendorf de 1.5 ml.

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

4.3.1 BISECCIONES

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

4.3.2 SECCIONES DE VIBRATOMO

Los embriones previamente fijados en Smith (Ver sección 4.2.1.4) o MEMFA (Ver sección 4.2.1.5), fueron embebidos en gelatina 7.5% e incubados por 4 horas a 45°C con el fin de inflar las cavidades y evitar que las células se desprendan durante el seccionamiento.

Luego, los embriones 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. Se realizaron secciones sagitales y transversales de 50 µm de espesor, utilizando una cuchilla metálica. Las

secciones fueron realizadas en un Vibratomo Oxford, con una velocidad de 2.5 rpm, una amplitud de 6 y un ángulo de 25°. Una vez cortadas, las secciones fueron transferidas y almacenadas en una solución PBS 1X (Ver sección 4.2.1.2) a 4 °C.

4.4 FOTOGRAFÍA DE EMBRIONES ENTEROS Y SECCIONES

Los embriones enteros, bisecciones y secciones, fueron fotografiados utilizando un estereoscopio Stemi SV6, de Carl Zeiss y un estereomicroscopio OLYMPUS CKX41.

Para las fotografías se usaron las cámaras AxioCam y OLYMPUS CKX41. Para procesamiento de imágenes se usaron los programas Axiovision 4.6.3 y Cellsense. Las imágenes posteriormente fueron editadas utilizando el programa Adobe Photoshop CS6.

5. RESULTADOS

5.1 EL DESARROLLO TEMPRANO DE *Hyloxalus nexipus*:

Los individuos de *H. nexipus* depositan sus huevos en masas de gelatina, cerca de fuentes de agua y colocan aproximadamente 15 huevos por postura (Anexo 1). El diámetro de los embriones es de aproximadamente 2.5 mm \pm 0.048 (Tabla 1). Los embriones presentan una coloración marrón oscura en el hemisferio animal, que va disminuyendo a lo largo del eje animal – vegetal.

El desarrollo temprano de *H. nexipus* es similar al desarrollo descrito para otras especies de dendrobatidos. El desarrollo fue dividido en 25 estadios desde el clivaje hasta la eclosión del renacuajo. Los estadios fueron clasificados en clivaje, blástula (Fig. 1), gastrulación (Fig. 2), neurulación (Fig. 4) y organogénesis (Fig. 5-6), hasta la eclosión del renacuajo. Estos estadios fueron determinados utilizando la tabla del desarrollo descrita para *Epipedobates machalilla* (Anexo 2) (del Pino *et al.*, 2004).

Los tiempos del desarrollo de *H. nexipus* se muestran en la tabla 2. El tiempo que se muestra en la tabla, en horas, corresponde al tiempo que un embrión tarda en llegar desde el estadio en el que se inician las observaciones, hasta los siguientes estadios. Los embriones de *H. nexipus* tardan aproximadamente 384 horas (16 días) desde el estadio 7, en el cual se iniciaron las observaciones, hasta el estadio 25, cuando eclosionan. El tiempo aproximado del

desarrollo fue calculado a partir de 3 posturas (Hn-001, Hn-002 y Hn-004). Debido a que no se obtuvieron todos los estadios y tiempos en una sola postura.

El tiempo de gastrulación de *H. nexipus* se muestra en la tabla 3. El tiempo de gastrulación de esta especie es de 1.4 días. Este tiempo fue calculado desde la formación del labio dorsal del blastoporo (estadio 10), hasta el cerramiento del blastoporo (estadio 13).

5.2 LA EXPANSIÓN DEL BLASTOCELE OCURRE DURANTE LA BLÁSTULA MEDIA EN *Hyloxalus nexipus*.

5.2.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA BLÁSTULA DE CÉLULAS GRANDES, CÉLULAS MEDIANAS Y CÉLULAS PEQUEÑAS (ESTADIO 7, 8 Y 9).

En la blástula de células grandes de *H. nexipus* se puede observar la diferencia de tamaño y de pigmentación entre las células animales y vegetales. Las células animales presentan pigmentación marrón oscura y un menor tamaño que las células vegetales (Fig. 1A). En la bisección sagital del embrión en estadio 7 (Fig. 1D) no se observa ninguna cavidad, así como tampoco se observa ningún pigmento alrededor de los núcleos de las células animales. En la bisección se puede apreciar de mejor manera la diferencia de tamaño entre las células animales y vegetales.

En el estadio de blástula de células medianas las células son más pequeñas que en el estadio anterior. En la vista externa del embrión se puede apreciar pigmento alrededor de los núcleos de las células animales (Fig. 1B). Sin embargo, en la bisección sagital presentada en la Fig. 1E no se puede observar claramente este pigmento. En esta bisección ya se puede observar la presencia del blastocele en el hemisferio animal.

En la Fig. 1C se observa una blástula de células pequeñas. En la bisección sagital de este embrión (Fig. 1F), no se puede observar la dimensión del blastocele debido a que el techo del blastocele colapsó durante la bisección. En la imagen se puede apreciar claramente el pigmento alrededor de los núcleos de las células del hemisferio animal.

5.3 EL ARQUENTERÓN DE *H. nexipus* SE ELONGA EN LA GÁSTRULA TARDÍA.

5.3.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA – LABIO DORSAL DEL BLASTOPORO (ESTADIO 10).

En este estadio, las células de la zona marginal comienzan a invaginarse, formando el labio dorsal del blastoporo. En la Fig. 2A, se observa al labio dorsal como una hendidura que se forma en la región subecuatorial del embrión. En una sección sagital (Fig. 2F) se pueden observar el blastocele extendido en todo el hemisferio animal y la formación de unas células alargadas denominadas células de botella. Estas células son las que inician la invaginación celular a través del labio dorsal del blastoporo.

5.3.2 MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA – TAPÓN DE YEMA GRANDE (ESTADIO 11).

En la figura 2B, se puede observar la morfología externa de un embrión en estadio 11. En este estadio se puede observar el inicio de la formación de un tapón de yema grande, producto de la invaginación celular, a través del labio dorsal del blastoporo y del labio ventral del blastoporo. En una sección sagital (Fig. 2G) se pueden observar la hendidura del labio dorsal, el inicio de la invaginación del labio ventral y la formación de una cavidad denominada arquenterón.

5.3.3 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA MEDIA-TAPÓN DE YEMA MEDIANO (ESTADIO 12).

En el estadio 12 (Fig. 2C), se puede observar que el tapón de yema ha reducido su tamaño debido a la invaginación celular que ocurre a través de labio dorsal y del labio ventral. En una sección sagital (Fig. 2H), se pueden observar la hendidura del labio dorsal, el labio ventral, el cleft de Brachet, que es un surco que separa el ectodermo del endomesodermo, el blastocele que ha reducido su tamaño y la presencia del arquenterón cerca del labio dorsal del blastoporo.

5.3.4 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA GÁSTRULA TARDÍA - TAPÓN DE YEMA PEQUEÑO (ESTADIO 12.5).

En la figura 2D se observa la morfología externa de un embrión en estadio 12.5. En este estadio se puede observar que el tapón de yema posee un tamaño menor que en estadios anteriores. Internamente, en una bisección sagital (Fig. 2I), se puede observar que el tamaño del blastocele es mucho menor que en el estadio anterior y que el arquenteron que se encuentra cerca al labio dorsal del blastoporo ha incrementado su tamaño, como consecuencia de la elongación de esta cavidad. En el labio ventral del embrión, el arquenterón también ha empezado a elongarse. Se puede observar el cleft de Brachet como un surco que se encuentra cerca del labio dorsal del blastoporo.

5.3.5 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA POST- GÁSTRULA (ESTADIO 13.5).

La figura 2E corresponde a la morfología externa de un embrión en estadio 13.5. En esta figura se puede observar la formación de una placa en forma de herradura, la placa neural y un surco que se forma en la línea media del embrión, este surco es el surco neural, se extiende desde el blastoporo hacia la región rostral del embrión. En una sección sagital de esta embrión (Fig. 2J), se puede observar la elongación y expansión total del arquenterón. También

se puede observar una acumulación de células cerca al blastoporo. Esta acumulación celular se denomina collar circumblastoporal.

5.4 EL RECUBRIMIENTO ENDODERMAL DEL NOTOCORDIO DE *Hyloxalus nexipus* OCURRE DURANTE LA NEURULA.

5.4.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA POST- GÁSTRULA (ESTADIO 13.5).

En la figura 3A se observa la morfología externa de un embrión en el estadio 13. En este embrión ya no se encuentra el tapón de yema, en su lugar se encuentra el blastoporo que se ha cerrado completamente, por la fusión del labio dorsal con el labio ventral. En una sección transversal de la región rostral del embrión (Fig. 3E), se pueden observar las tres capas germinales. El ectodermo se encuentra en la superficie, el endodermo que se encuentra en contacto con el Arquenterón y el mesodermo paraxial y el notocordio en el medio. También se puede observar el notocordio sin recubrimiento endodermal, lo que indica la presencia del GRP (Gastrocoel roof plate), además se puede observar la presencia de las crestas endodermales a los lados del notocordio.

5.4.2 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LA NEURULA (ESTADIOS 14, 15, 16).

La figura 3B muestra la morfología externa de un embrión en estadio de néurula temprana. En el estadio 14 externamente se puede observar la placa neural en la región rostral del embrión, el surco neural que se extiende a lo largo de la línea media y el blastoporo ubicado en la región caudal del embrión. Los pliegues neurales en este estadio se encuentran elevados alrededor de la placa neural. En una sección transversal de la región rostral del embrión (Fig. 3F), se observan las tres capas germinales ectodermo, mesodermo paraxial y endodermo, además del notocordio ubicado en la parte central del embrión.

La figura 3C muestra la morfología externa de un embrión en estadio de néurula media. En el estadio 15 se puede observar a los pliegues neurales elevados y cerca de la línea media del embrión, formando el surco neural a lo largo de la línea. Se observa el blastoporo en la región caudal del embrión. En una sección transversal (Fig. 3G) se puede observar la estructura del surco neural, las tres capas germinales y el notocordio que ya se encuentra cubierto por endodermo.

En la figura 3D se indica la morfología externa de un embrión en estadio 16, de néurula tardía. En este estadio se observan los pliegues neurales fusionados. En una sección transversal del embrión (Fig. 3H), se observa como los pliegues neurales al fusionarse en la línea media han formado el tubo neural. También se puede observar el notocordio en la mitad del embrión y a los costados de esta estructura se encuentra mesodermo paraxial, que formaran los somitas.

5.5 LA FORMACIÓN DE LA YEMA DE LAS BRANQUIAS EN *H. nexipus* COMIENZA EN EL ESTADIO 19 Y LA RAMIFICACIÓN DE LAS BRANQUIAS EN EL ESTADIO 20.

5.5.1 MORFOLOGIA DEL ESTADIO DE YEMA DE LA COLA, ESTADIO DE RESPUESTA MUSCULAR Y ESTADIO DE YEMA DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 17, 18 Y 19).

En la figura 4A, se muestra una vista dorsal de un embrión en estadio de yema de la cola y en la figura 4B se muestra una vista lateral de un embrión en el mismo estadio. En este estadio, se puede observar la presencia de la yema de la cola, los pronefros ubicados detrás de la cabeza, y los cuatro arcos branquiales.

La figura 4C muestra una vista dorsal de un embrión en estadio 18 y en la figura 4D se muestra una vista lateral de un embrión en el mismo estadio. En este estadio el embrión comienza a tener respuesta muscular inmediata ante estímulos mecánicos. Externamente en el embrión se puede observar la yema de la cola, además de la presencia de los arcos branquiales, los pronefros y los somitas.

En la figura 4D, se muestra la morfología externa de un embrión en estadio de yema de las branquias, esta figura es una vista dorsal de este estadio y la figura 4E es una vista lateral del mismo estadio. El embrión en estadio 19 sigue alargándose y como principal característica empiezan a sobresalir las yemas de las branquias. Las yemas de las branquias se empiezan a formar a partir de los arcos branquiales anteriores. Se puede observar también el arco

mandibular, el arco hioideo, el arco branquial posterior, los pronefros y los somitas en todo el dorso del embrión.

5.5.2 MORFOLOGIA DE LOS ESTADIOS DE DESARROLLO DE BRANQUIAS (ESTADIOS 20, 21, 23).

En la figura 5 se observan los estadios en los que ocurre el desarrollo de las ramas de las branquias. En la figura 5A se observa un embrión en estadio 20. En un acercamiento a la cabeza (Fig. 5B) se puede observar el estomodeo y la rama de la branquia anterior que presenta 8 ramificaciones. La rama posterior no presenta ramificaciones. En la figura 5C se observa un embrión en estadio 21, las ramificaciones de las branquias se han alargado un poco más y en un acercamiento a las branquias (Fig. 5D) se puede observar que la rama anterior presenta 10 ramificaciones y la rama posterior no se ha ramificado. En el estadio 23 (Fig. 5E), el embrión ya ha alcanzado el desarrollo total de las branquias. Después de este estadio, las branquias no se ramifican ni se extienden más. En un acercamiento a la cabeza del embrión (Fig. 5F), se puede observar que la rama anterior de las branquias presenta 10 ramificaciones y la rama posterior de la branquias presenta 3 ramificaciones.

6. DISCUSIÓN

Este estudio se basa en la descripción morfológica del desarrollo temprano de *Hyloxalus nexipus*, siendo esta la séptima especie de Dendrobatido, en la cual se ha estudiado el desarrollo embrionario. En trabajos anteriores se ha estudiado otras especies: *Epipedobates machalilla*, *Epipedobates tricolor*, *Epipedobates anthonyi*, *Ameerega bilinguis*, *Dendrobates auratus* y una especie del género *Hyloxalus* (*Hyloxalus vertebralis*) (Del Pino *et al.*, 2004; Hervas *et al.*, 2015).

Cada una de estas especies ha presentado diferencias en cuanto a la temporalidad del desarrollo y al diámetro del huevo entre ellas (del Pino *et al.*, 2004; del Pino *et al.*, 2007; Hervas *et al.*, 2015) (Anexo 3) y con otras especies pertenecientes a diferentes familias de anuros (del Pino *et al.*, 2007) (Anexo 4). A pesar de estas diferencias de temporalidad y de tamaño de huevo, se ha observado que los miembros de la familia Dendrobatidae comparten un patrón similar de gastrulación (del Pino *et al.*, 2007). Es aquí donde radica la importancia de estudiar otra especie de dendrobátidos. De esta manera se puede proponer un patrón general del desarrollo para esta familia. El desarrollo de *H. nexipus*, debido a la similitud que presenta con otros dendrobátidos, se dividió en 25 estadios desde el clivaje hasta la eclosión del renacuajo.

6.1 EN DENDROBÁTIDOS, LA ESTRATEGIA REPRODUCTIVA TERRESTRE NO ESTÁ RELACIONADA CON LOS DIÁMETROS DEL HUEVO Y EL TIEMPO DEL DESARROLLO.

Los dendrobatidos presentan una estrategia reproductiva diferente a la estrategia que presenta la rana *Xenopus laevis* y otras especies de ranas de diferentes familias (Anexo 3). El modo reproductivo que presentan estas ranas es derivada comparada con la estrategia que presentan las ranas que desarrollan toda su etapa embrionaria dentro del agua (Gomez-Mestre *et al.*, 2012). Los dendrobatidos, incluyendo a *Hyloxalus nexipus*, colocan sus huevos sobre la hojarasca cerca de riachuelos, presentan cuidado parental por parte de uno de los padres, y ponen una cantidad no muy numerosa de huevos. Los embriones se desarrollan sobre la hojarasca hasta que están a punto de eclosionar, luego el padre lleva los embriones en su espalda hasta una corriente de agua para que los embriones continúen con su etapa acuática siendo dependientes de agua en su etapa larval (Duellman y Trueb, 1986; Wells, 2007).

Esta estrategia reproductiva terrestre diverge de la estrategia acuática, que está representada principalmente por la rana *Xenopus laevis*. Una derivación de esta estrategia acuática es la elaboración de un nido de espuma que flota sobre el agua, este modo reproductivo es el que presentan las ranas del género *Engystomops* (Duellman y Trueb, 1986). La estrategia que poseen los dendrobatidos, a pesar de ser terrestre, se diferencia de otras ranas como *Gastrotheca riobambae* y *Eleutherodactylus coqui*. En *G. riobambae* el desarrollo se da en el marsupio de la madre hasta su eclosión. En este momento los renacuajos necesitan de una fuente de agua para seguir su desarrollo (del Pino y Loor-Vela, 1990). En *E. coqui* y otras

ranas de clado Terrarana se da un desarrollo embrionario directo sin etapa acuática, considerándose una de las estrategias embrionarias más divergentes (Heinicke *et al.*, 2009).

Las especies que se desarrollan en tierra tienden a tener posturas poco numerosas y el diámetro de los huevos es mayor que los de las especies que se desarrollan en agua (Gomez-Mestre *et al.*, 2012). Esto posiblemente se debe a que los huevos que se desarrollan en tierra necesitan de una mayor superficie y de una mayor cantidad de capas de gelatina delgadas para evitar la pérdida de agua, proporcionar al embrión un mejor intercambio gaseoso y protección contra factores externos (Altig y McDiarmid, 2007).

Los diámetros de los huevos de los anfibios es variable (Anexo 3) y se puede notar la diferencia entre los huevos terrestres y acuáticos, inclusive dentro de miembros de la misma familia se puede observar esta variación de tamaños de los huevos, como es el caso de los dendrobatidos que varían desde 1.6 hasta 3.5mm (del Pino *et al.*, 2007; Hervas *et al.*, 2015). Con este estudio se corrobora que esta diferencia de diámetros de huevos entre los dendrobátidos no es una característica que esté relacionada con la estrategia reproductiva. *Hyloxalus nexipus* tiene un tamaño de 2.5 mm (Tabla 1), un tamaño intermedio entre los rangos de esta familia. A pesar de esta variedad de diámetros de huevo, se ha podido observar que no existe diferencias en el patrón de desarrollo temprano, únicamente en la temporalidad del desarrollo de cada una de estas especies (del Pino *et al.*, 2007).

El tiempo de desarrollo de *H. nexipus* es de 16 días desde el estadio 7 hasta la eclosión de los renacuajos (Tabla 2), un tiempo menor que el tiempo registrado para *E. machalilla*, que se desarrolla en 19.4 días desde el estadio 7 hasta la eclosión (del Pino *et al.*, 2004). Los tiempos proporcionados en este estudio fueron tomados a la temperatura ambiente del

laboratorio que fluctúa entre los 18° C y los 22°C. La tasa del desarrollo depende de la temperatura (Duellman y Trueb, 1994). Es por esta razón que se sugiere que para siguientes estudios se pueda analizar los tiempos del desarrollo bajo condiciones controladas.

6.2 LOS BLASTÓMEROS ANIMALES DE *Hyloxalus nexipus* POSEEN PIGMENTO CELULAR AL IGUAL QUE *Xenopus laevis*

La blástula de *H. nexipus*, es similar a la blástula de otros dendrobátidos (del Pino *et al.*, 2004; del Pino *et al.*, 2007; Hervas *et al.*, 2015) . Durante la blástula se forma una cavidad desplazada hacia el hemisferio animal denominada blastocele (Wolpert, 2007). La presencia de esta cavidad en *H.nexipus* se observa a partir del estadio de blástula de células medianas (estadio 8), a diferencia de *Epipedobates machalilla* en el que se registra la presencia del blastocele en el estadio de blástula de células grandes (estadio 7) (del Pino *et al.*, 2004).

Los blastómeros animales en los dendrobatidos, incluyendo a *H. nexipus*, poseen pigmento celular oscuro (del Pino *et al.*, 2004; Hervas *et al.*, 2015), que les proporciona a los embriones protección ante la radiación ultra violeta (Blaustein y Belden, 2003). Esto es diferente en embriones que no están expuestos a los rayos UV, que no poseen pigmentación debido a que su desarrollo se da en lugares oscuros como es el caso de las ranas Hemifractidas (Schmid *et al.*, 2012), o algunas especies de ranas Centrolenidas que tampoco presentan pigmento celular como *Hyalinobatrachium fleischmanni*, debido a que su lugar de ovoposición es debajo de las hojas y no necesitan protección contra los rayos solares (Salazar-

Nicholls y del Pino, 2015). *H. nexipus* además de poseer este pigmento celular, también posee gránulos de pigmento alrededor de los núcleos, al igual que otras especies de ranas como *Engystomops randi* y *Engystomops coloradorum* (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Esta distribución de los gránulos de pigmento en el hemisferio animal es establecida durante el estadio 3 de la oogenesis. En *X. laevis*, *Shroom 2* regula la acumulación de pigmento en la corteza animal, modificando la cantidad de la γ -tubulina en los blastómeros animales. Una cantidad baja del mRNA materno de *Shroom2* en los embriones de *Physalaemus pustulosus* da como resultado huevos despigmentados, a diferencia de la cantidad alta de mRNA materno de *Shroom2* presente en el embrión pigmentado de *Xenopus laevis* (Lee *et al.*, 2009). Para poder decir con total certeza que los embriones con pigmento de *Hyloxalus nexipus* poseen mayor cantidad de mRNA materno de *Shroom2*, se necesita realizar un estudio molecular y comparativo sobre la expresión de este gen en esta especie y otros dendrobátidos.

6.3 ¿QUÉ INFLUYE EN EL PATRÓN DE GASTRULACIÓN: FILOGENIA O ESTRATEGIA REPRODUCTIVA?

La gastrulación comienza con la formación del labio dorsal del blastoporo en la región subecuatorial del embrión (Gilbert, 2003). En *H. nexipus*, al igual que en otros dendrobátidos, la formación del labio dorsal se evidencia durante la gástrula temprana (del Pino *et al.*, 2004; Montenegro-Larrea y del Pino, 2011; Hervas *et al.*, 2015) . Al igual que en *X. laevis*, durante la formación del labio dorsal del blastoporo se puede observar la formación de las células de botella (Gilbert, 2003). Al formarse este tipo de células, comienza la involución celular desde

la superficie al interior del embrión (Keller *et al.*, 2003). Durante la internalización de las células del endodermo y mesodermo en el embrión se va a formar un surco en la región dorsal. Este surco es el Cleft de Brachet, que separa las células superficiales de las células vegetales internas (Winklbauer y Schürfeld, 1999). En *Hyloxalus nexipus*, se puede observar la formación de este surco durante la gástrula temprana en el lado dorsal del embrión al igual que en *Hyloxalus vertebralis* (Hervas *et al.*, 2015).

La elongación e inflación del arquenterón es uno de los objetivos de la gastrulación. La elongación y la inflación son dos eventos que ocurren separadamente. Primero se da la elongación y posteriormente se da la inflación, posiblemente como un resultado del influjo de líquido que viene desde el blastocele (Ewald *et al.*, 2004). En *H. nexipus* se puede observar esta separación de los eventos. El arquenterón en *H. nexipus* empieza a aparecer durante la gástrula temprana y media, pero no comienza a elongarse hasta la gástrula tardía en el estadio 12.5. La inflación ocurre en la post-gástrula, después de cerrado el labio dorsal del blastoporo. Esto se puede observar en otras especies de dendrobátidos como *Epipedobates machalilla*, *E. anthonyi*, *E. tricolor* e *H. vertebralis* (del Pino *et al.*, 2004; Montenegro-Larrea & del Pino, 2011; Hervas *et al.*, 2015). Sin embargo, en otras especies de dendrobatidos como *A. bilinguis*, el arquenterón se elonga desde el estadio 12 y se infla en la post-gástrula. En *D. auratus*, la elongación e inflación del arquenterón ocurren simultáneamente en el estadio 12. Posiblemente, esta diferencia se deba a la diferencia del tamaño de huevos de los dendrobatidos (Hervas *et al.*, 2015). La reducción del tamaño del blastocele se da en conjunto con el aumento del arquenterón en los dendrobátidos. Durante la gastrulación el blastocele y el arquenterón están separados por un tabique de células; para el final de la gastrulación el blastocele ya ha desaparecido y el arquenterón ya está totalmente elongado. En la post-gástrula

cuando ya se encuentra el arquenterón elongado y el blastoporo cerrado se observa una acumulación de células en *Hyloxalus nexipus* y otros dendrobatidos, esta acumulación se ubica cerca al blastoporo y se denomina collar circumblastoporal. (del Pino *et al.*, 2004; del Pino *et al.*, 2007; Montenegro-Larrea & del Pino, 2011; Hervas *et al.*, 2015).

Las diferencias en la gastrulación dentro de los dendrobatidos no sólo se observan en la temporalidad de algunos de los eventos de la gastrulación como, la elongación e inflación del notocordio, sino también en los tiempos de gastrulación que presenta cada especie de dendrobátidos. Teniendo un rango de tiempos de gastrulación entre 1.4 días a 3 días y un rango de diámetros de huevos que va desde 1.6 mm hasta 3.5mm. *H. nexipus* posee un tiempo de gastrulación menor que otros dendrobatidos (1.4 días) y un diámetro de 2.5mm (Anexo 3 y Anexo 4). A pesar de estas diferencias de temporalidad durante la gastrulación y de diámetro de huevo, no se ha observado que haya diferencias en el patrón de gastrulación que presentan todos los dendrobátidos hasta ahora estudiados (del Pino *et al.*, 2007; Elinson & del Pino, 2012; Hervas *et al.*, 2015).

Se han descrito tres patrones de gastrulación para los anuros (Anexo 5) (del Pino *et al.*, 2007). El primer patrón de gastrulación que se observa es un patrón de desarrollo rápido que se encuentra presente en ranas que se desarrollan en el agua como *Xenopus laevis* y las ranas del género *Engystomops*. La elongación del Arquenterón en estas ranas ocurre durante la gástrula temprana y la elongación del notocordio durante la gástrula media (del Pino *et al.*, 2007; Romero-Carvajal *et al.*, 2009). El segundo patrón que siguen los dendrobatidos, incluyendo *H. nexipus*, es un patrón de desarrollo lento y ocurre en ranas con estrategia reproductiva terrestre. En este patrón, la elongación del notocordio ocurre durante la gástrula media y tardía y la elongación del notocordio ocurre después de cerrado el blastoporo. Al tener

convergencia y extensión dorsal retardada, en los dendrobatidos se forma el collar circumblastoporal (del Pino *et al.*, 2007). El tercer patrón también es lento y se da en ranas con desarrollo terrestre como *G. riobambae*. En este patrón de gastrulación, la elongación del arquenterón y del notocordio ocurren en la post-gástrula, después de cerrado el blastoporo. Este retraso en los movimientos de la gastrulación formara una acumulación de células alrededor del blastoporo, esta acumulación se llama disco embrionario (del Pino *et al.*, 2007).

Elinson y del Pino (2012), plantean que el patrón de gastrulación puede estar relacionado con la extensa historia filogenética de los anuros o podría deberse a las diferentes adaptaciones reproductivas que poseen las ranas. Tomando en cuenta la historia filogenética que poseen únicamente la familia de dendrobátidos, se puede decir que todas las especies pertenecientes a esta familia analizadas en el laboratorio, corresponden a 3 clados distintos. (Pyron y Wiens, 2011) (Anexo 6). Si estas especies, que se encuentran en clados diferentes, poseen un mismo patrón de gastrulación que no varía a pesar de no ser especies hermanas, sugiere que este patrón de gastrulación estaba presente ya en el ancestro común de todos los dendrobátidos.

Por otro lado, está la estrategia reproductiva que desarrollaron los dendrobátidos al colocar sus huevos sobre la hojarasca cerca de fuentes de agua y presentar cuidado parental por parte de uno de los padres (Gomez-Mestre *et al.*, 2012). Esta estrategia podría influir en el patrón del desarrollo embrionario en estas especies de ranas, sin embargo a pesar de presentar la misma estrategia reproductiva, los tiempos de gastrulación en dendrobátidos son variables.

Posiblemente, el patrón de gastrulación y el desarrollo en general de los dendrobátidos, puede ser un proceso flexible, que sólo es consecuencia de la estrategia

reproductiva que poseen los miembros de esta familia. Por el contrario, es posible que el desarrollo tenga etapas que son conservadas y estos caracteres pertenecerían a la historia filogenética de esta familia. En este estudio se plantea que el patrón de gastrulación de los dendrobátidos no sólo es consecuencia de la estrategia reproductiva que poseen estas ranas, sino también la historia filogenética.

A pesar de haberse estudiado 3 de los 4 clados de la familia Dendrobatidae (4 especies del clado perteneciente a los géneros *Epipedobates*, *Colostethus*, *Ameerega*; 2 especies del clado de los *Hyloxalus*; 1 especie del clado de los *Dendrobates*) (Pyron y Wiens, 2011), se recomienda realizar estudios morfológicos futuros en alguna especie del clado que falta estudiar (clado de los *Allobates*) como *Allobates zaparo* o *Allobates femoralis*, para observar si no existe ningún cambio en el patrón general del desarrollo que se propone en este estudio.

Se sugiere realizar estudios moleculares en las especies de dendrobátidos ya analizadas morfológicamente, para observar si existe alguna diferencia a nivel genético en el patrón del desarrollo de esta familia. Además de realizar un estudio alterando la estrategia reproductiva de los dendrobátidos y de esta manera observar si el patrón del desarrollo cambia. Estos estudios demostrarían si los patrones de gastrulación en las diferentes especies de anuros son el resultado de la estrategia reproductiva o de la historia filogenética.

6.4 LA NEURULACIÓN DE *Hyloxalus nexipus* SIGUE EL PATRÓN DE DESARROLLO DE ANFIBIOS

En *H. nexipus*, el notocordio se puede evidenciar desde el estadio de post-gástrula, al igual que otras especies de dendrobátidos (Hervas *et al.*, 2015). En este estadio el notocordio se encuentra expuesto en la parte más rostral en *H. nexipus*. Esto podría demostrar la presencia de mesodermo expuesto en esta parte, conocido como GRP. Esta estructura determina la asimetría izquierda- derecha de los órganos del cuerpo (Blum *et al.*, 2009). A los lados del mesodermo expuesto y del notocordio se observan las crestas endodermales, que indican el límite del recubrimiento endodermal del arquenterón. La presencia de GRP en esta especie y en otras especies de ranas sugeriría que esta es una estructura conservada entre especies (Shook *et al.*, 2004; Sáenz-Ponce *et al.*, 2012; Salazar- Nicholls & del Pino, 2015). Es por esta razón que se necesita realizar estudios que demuestren molecularmente la presencia de GRP en *H. nexipus*, entre estos estudios se podría incluir una tinción de cilios del mesodermo expuesto.

La presencia del notocordio es la evidencia de que han existido los movimientos de convergencia y extensión dorsal en el embrión (Keller *et al.*, 1985). La manera de evidenciar la modularidad del desarrollo en los anuros es mediante análisis moleculares. El análisis de dos marcadores mesodermales *Brachyury* y *Lim1* (Benítez y Del Pino, 2002; Venegas-Ferrín *et al.*, 2010), ha demostrado que existen dos organizadores en los anuros. El organizador de la cabeza (placa precordial) y el organizador del tronco (notocordio) (Elinson y del Pino, 2012). Estos dos genes se expresan en todos los anuros pero en tiempos diferentes. El gen *Brachyury*

se expresa en la placa precordial y el notocordio (Smith, 2009) , y el gen *Lim1* se expresa en el blastoporo y el notocordio (Taira *et al.*, 1992). En los dendrobatidos, la acción de estos marcadores en el notocordio se da después del cerramiento del blastoporo, a diferencia de las ranas con desarrollo rápido en la cual los dos marcadores están presentes en los dos organizadores desde la gástrula media (Revisado en Elinson y del Pino, 2012). En *Hyloxalus nexipus*, es necesario realizar el estudio de la expresión de *Brachyury* y *Lim1*. Con este estudio se podrá observar si no existen diferencias en el comienzo de la elongación del notocordio de *H. nexipus*, en comparación con otras especies de dendrobátidos analizadas anteriormente.

Luego de la elongación del notocordio comienza la neurulación. El proceso de neurulación es de gran importancia debido a que en este paso se forman los precursores del sistema nervioso central y son llevados al interior de la epidermis (Davidson y Keller, 1999). En *H. nexipus* como en *Xenopus laevis* y otros dendrobatidos la placa neural se forma durante la néurula temprana, los pliegues neurales se elevan y empiezan a acercarse a la línea media durante la néurula media, y durante la néurula tardía los pliegues neurales se fusionan en la línea media y dan origen al tubo neural (Nieuwkoop y Faber, 1994; Harrington *et al.*, 2009; Hervas *et al.*, 2015). No se observó ninguna diferencia en este proceso entre los dendrobátidos, ni con otras especies de anuros, lo que corrobora que es un proceso altamente conservado entre las especies.

6.5 *Hyloxalus nexipus* TIENE UN DESARROLLO AVANZADO SIMILAR A *Hyloxalus vertebralis* Y OTROS DENDROBÁTIDOS.

Durante los estadios avanzados del desarrollo se determina la formación de los órganos futuros del organismo, a partir de las tres capas germinales (Asashima *et al.*, 2009). En *H. nexipus* al igual que *Xenopus laevis* se puede determinar la presencia de somitas, los arcos branquiales y los pronefros, estructuras derivadas del mesodermo y que se encuentran a cada lado de los embriones (Asashima *et al.*, 2009).

Al igual que en otras especies de dendrobatidos en el estadio 18 empieza la respuesta muscular a los estímulos mecánicos, al igual que en *H. vertebralis* y *Epipedobates machalilla* (del Pino *et al.*, 2004; Hervas *et al.*, 2015). La presencia de respuesta muscular en el embrión se debe a que las fibras musculares ya están formadas (Pourquié, 2003). En el estadio 19 la yema de las branquias sobresale de los arcos branquiales anteriores (del Pino *et al.*, 2004). En *H. nexipus*, así como en otros dendrobatidos, en este estadio comienza el desarrollo de las branquias hasta el estadio 23 donde se da el máximo desarrollo de branquias. *H. nexipus* al igual que *H. vertebralis* eclosiona en el estadio 25, sin branquias y con el opérculo totalmente cerrado (Hervas *et al.*, 2015).

6.6 LA RAMIFICACIÓN DE LAS BRANQUIAS ES DIFERENTE PARA CADA ESPECIE DE DENDROBÁTIDO ANALIZADO.

La ramificación de las branquias parece ser propia de cada especie (del Pino *et al.*, 2004; Hervas *et al.*, 2015). Dentro de la familia Dendrobatidae, existen claras diferencias en la ramificación de las branquias entre una especie y otra (Anexo 7). La función que cumplen las branquias es la de obtener oxígeno para el intercambio gaseoso entre el embrión y el exterior (Shield y Bentley, 1973). Los embriones, cuando se encuentran a bajas temperaturas y altas concentraciones de O₂, tienden a desarrollar branquias cortas; mientras que los embriones que se encuentran a altas temperaturas y a altas concentraciones de CO₂, tienden a desarrollar branquias más largas (Altig y McDiarmid, 1999).

Las branquias de *Hyloxalus nexipus* son más ramificadas y largas que las de otras especies de dendrobatidos. Esta especie posee 10 ramificaciones en la rama anterior y tres en la posterior. De las 4 otras especies de dendrobátidos analizadas (*Epipedobates machalilla*, *E. tricolor*, *H. vertebralis* y *Dendrobates auratus*), *D. auratus* tiene 9 ramificaciones en la rama anterior y 2 en la posterior (Hervas *et al.*, 2015), *E. tricolor* e *H. vertebralis* tienen 8 ramificaciones en la rama anterior y ninguna ramificación en la rama posterior (del Pino *et al.*, 2004; Hervas *et al.*, 2015). Por último, *E. machalilla* tiene 6 ramificaciones en la rama anterior y ninguna ramificación en la rama posterior (del Pino *et al.*, 2004).

No se han realizado estudios que determinen el porqué de estas diferencias en el número de ramificaciones a pesar de ser miembros de la misma familia. Uno de los factores que podría determinar esta diferencia en la extensión y en el número de ramificaciones podría

ser el rango geográfico que ocupan estas especies. *Hyloxalus nexipus* se encuentra en la provincia de Morona Santiago, en las estribaciones bajas de la Cordillera Oriental de los Andes (Coloma, 1995). *E. machalilla* se encuentra en el Ecuador, en las provincias de El Oro, Los ríos, Bolívar, Cotopaxi, Guayas, Cañar y Manabí, desde los 10 hasta los 510 msnm (Coloma *et al.*, 2014). *E. tricolor*, se distribuye desde los 750 a 1769 msnm, en las estribaciones de los Andes de las provincias de Bolívar y Cotopaxi (Coloma, 2013). *H. vertebralis* se encuentra en los valles interandinos y estribaciones occidentales de los Andes, en el sur de Ecuador, entre los 1770 y 3500 msnm (Coloma, 1995). *D. auratus* no se encuentra en el Ecuador y se distribuye desde el sudeste de Nicaragua hasta el noreste de Colombia (Solis *et al.*, 2004). Como se observa, cada especie posee un hábitat distinto que puede ser el que influye en la ramificación de las branquias de cada una de acuerdo a las necesidades de oxígeno que tengan los embriones en cada lugar de la ovoposición. Al observar que, a pesar de cambiarse el ambiente de los embriones, por la reproducción en cautiverio, la ramificación de las branquias no varía, se puede plantear la hipótesis que el patrón de ramificación de las branquias, está definido genéticamente y no varía de un ambiente a otro. Sin embargo, para poder responder a esa hipótesis es necesario, que se estudie de manera más detallada y estadística la ramificación de las branquias de cada especie.

6.7 EL DESARROLLO TEMPRANO EN LOS DENDROBÁTIDOS SIGUE UN PATRÓN GENERAL.

En los dendrobátidos existen diferencias en los tiempos del desarrollo y de gastrulación, diámetro de huevo y en el desarrollo de las branquias. *H. nexipus* se desarrolla de una manera similar a otros dendrobátidos antes analizados, lo que sugiere la existencia de un patrón general del desarrollo para los dendrobatidos.

Se recomienda realizar estudios moleculares y morfológicos en el clado que falta estudiar de dendrobátidos, además de realizar estudios moleculares de expresión génica en las especies de dendrobátidos ya estudiados. Además se sugiere realizar estudios en los que se altere la estrategia reproductiva y el ambiente en el que se desarrollan los dendrobátidos, para observar si el patrón del desarrollo es la respuesta a la estrategia reproductiva que presentan los miembros de esta familia.

7. LITERATURA CITADA

Altig, R., y McDiarmid, R. W. (1999). Tadpoles- The biology of Anuran larvae. University of Chicago. U.S.A.

Altig, R., y McDiarmid, R. W. (2007). Morphological Diversity and Evolution of Egg and Clutch Structure in Amphibians. *Herpetological Monographs*, 21(1).

Asashima, M., Ito, Y., Chan, T., Michiue, 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(6), 1309–1320.

Benítez, M. S., y Del Pino, E. M. (2002). Expression of brachyury during development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *Developmental Dynamics*, 225(4), 592–596.

Blaustein, R., y Belden, L. K. (2003). Amphibian defenses against UV-B radiation. *Evolution & Development*, 5(1), 89–97.

Blum, M., Weber, T., Beyer, T., y Vick, P. (2009). Evolution of leftward flow. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(4), 464–471.

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

Coloma, L. A., Frenkel, C. y Ortiz, D. A. (2013). *Epipedobates tricolor*. En: Ron, S. R., Guayasamin, J. M., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A., Ortiz, D. A. y Nicolalde, D. A. 2014. *AmphibiaWebEcuador*. Version 2014.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad

Católica del Ecuador. <<http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/FichaEspecie.aspx?Id=1270>>, acceso octubre 09, 2015.

Coloma, L. A., Frenkel, C., y Ortiz, D. A. (2010). *Epipedobates machalilla*. En: Ron, S. R., Guayasamin, J. M., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A., Ortiz, D. A. y Nicolalde, D. A. 2014. AmphibiaWebEcuador. Version 2014.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <<http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/FichaEspecie.aspx?Id=1242>>, acceso octubre 09, 2015.

Davidson, L. a, y Keller, R. E. (1999). Neural tube closure in *Xenopus laevis* involves medial migration, directed protrusive activity, cell intercalation and convergent extension. *Development* (Cambridge, England), *126*(20), 4547–4556.

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

del Pino, E. M., y Loor-Vela, S. (1990). The pattern of early cleavage of the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. *Development* (Cambridge, England), *110*(3), 781–9.

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

Desnitskiy, A. G. (2011). Ontogenetic diversity and early development of frogs in the South American family Cycloramphidae. *Phyllomedusa*, *10*(1), 7–13.

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

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

Elinson, R. P., y del Pino, E. M. (2012). Developmental diversity of amphibians. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *1*(3), 345–369.

Ewald, A. J., Peyrot, S. M., Tyszka, J. M., Fraser, S. E., y Wallingford, J. B. (2004). Regional requirements for Dishevelled signaling during *Xenopus* gastrulation: separable effects on blastopore closure, mesendoderm internalization and archenteron formation. *Development (Cambridge, England)*, *131*(24), 6195–6209.

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

Gomez-Mestre, I., Pyron, R. A., y Wiens, J. J. (2012). Phylogenetic analyses reveal unexpected patterns in the evolution of reproductive modes in frogs. *Evolution*, *66*(12), 3687–3700.

Haddad, C. F. B., y Prado, C. P. (2005). Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience*, *55*(3), 207.

Harrington, M. J., Hong, E., y Brewster, R. (2009). Comparative analysis of neurulation: First impressions do not count. *Molecular Reproduction and Development*, *76*(10), 954–965.

Heinicke, M. P., Duellman, W. E., Trueb, L., Means, D. B., Macculloch, R. D., y Hedges, S. B. (2009). A new frog family (Anura: Terrarana) from South America and an expanded direct-developing clade revealed by molecular phylogeny. *Zootaxa*, 35(2211), 1–35.

Hervas, F., Torres, K. P., Montenegro-larrea, P., y Pino, E. M. (2015). Development and gastrulation in *Hyloxalus vertebralis* and *Dendrobates auratus* (Anura : Dendrobatidae). *Amphibian and reptile conservation*. 8(1), 121–135.

Kay, B. K y Peng, H. B. (1991). *Xenopus laevis*: Practical uses in cell and molecular biology. Academic Press, Inc., California, U.S.A.

Keller, R., Davidson, L., y Shook, D. R. (2003). How we are shaped: The biomechanics of gastrulation. *Differentiation*, 71(3), 171–205.

Keller, R. E., Danilchik, M., Gimlich, R., y Shih, J. (1985). The function and mechanism of convergent extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 89 Suppl, 185–209.

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

Montenegro-Larrea P., y del Pino, E.M. (2011). La gastrulación de *Epipedobates anthonyi* (Anura: Dendrobatidae). *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 32: 24–32.

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

Parker, J. y Haswell, W. (1987). Textbook of Zoology: Vertebrates. Seventh edition. Mcmillan & Co., Ltda. Australia.

Pourquié, O. (2003). Vertebrate somitogenesis: A novel paradigm for animal segmentation? *International Journal of Developmental Biology*, 47(7-8), 597–603.

Pyron, A. R., & Wiens, J. J. (2011). A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(2), 543–583.

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(6), 1444–1454.

Rugh, R. (1962). Experimental embryology: Techniques and procedures. Minneapolis: Burgess.

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

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.

Schmid, M., Steinlein, C., Bogart, J. P., Feichtinger, W., Haaf, T., Nanda, I., del Pino, E. M., Duellman, W., y Hedges, S. B. (2012). The Hemiphractid Frogs: Phylogeny, Embryology. Life History and Cytogenetics. *Cytogenetic and Genome Research*, 138(2-4), 69–83.

Shield, J. W., y Bentley, P. J. (1973). Respiration of some urodele and anuran amphibia. I. In water, role of the skin and gills. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology*, 46(1), 17–28.

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(1), 163–185.

Smith, J. C. (2009). Forming and interpreting gradients in the Early *Xenopus* Embryo. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1–13.

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

Solís, F., Ibáñez, R., Jaramillo, C., Chaves, G., Savage, Y., Köhler, G., Jungfer, K.H., Bolívar, W., y Bolaños, F. (2004). *Dendrobates auratus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. Available: <http://www.iucnredlist.org> [Acceso: 9 Septiembre 2015].

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

Taira, M., Jamrich, M., Good, P. J., y Dawid, I. B. (1992). The LIM domain-containing homeobox gene *Xlim-1* is expressed specifically in the organizer region of *Xenopus* gastrula embryos. *Genes & Development*, 6(3), 356–366.

Venegas-Ferrin, 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(1), 195–202.

Winklbauer, R., y Schürfeld, M. (1999). Vegetal rotation, a new gastrulation movement involved in the internalization of the mesoderm and endoderm in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)*, 126(16), 3703–3713.

Wells, K. D. (2007). *The ecology and behavior of amphibians*. Univ. of Chicago Press, Chicago.

Warkentin, K. M. (2000). Environmental and developmental effects on external gill loss in the red-eyed tree frog, *Agalychnis callidryas*. *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ*, 73(5), 557–565.

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

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

8. FIGURAS

Figura 1. Expansión del blastocele en la blástula media. Morfología de los estadios de blástula de células grandes, medianas y pequeñas de *H. nexipus* (estadios 7, 8 y 9)

Figura 1. Expansión del blastocele en la blástula media. Morfología de los estadios de blástula de células grandes, medianas y pequeñas de *H. nexipus* (estadios 7, 8 y 9): A, B y C, son vistas laterales. El hemisferio animal está orientado hacia arriba. A la izquierda de cada embrión se encuentra el esquema que indica la orientación de las bisecciones sagitales en D, E y F. (A) Vista externa de la blástula de células grandes. (B) Vista externa de la blástula de células medianas. (C) Vista externa de la blástula de células pequeñas. (D) Bisección sagital de A, el hemisferio animal orientado hacia arriba sin presencia de blastocele (bl). (E) Bisección sagital de B. El hemisferio animal está orientado hacia arriba. Se observa el blastocele y presencia de pigmento alrededor de los núcleos de las células animales. (F) Bisección sagital de C. El hemisferio animal está orientado hacia arriba. El blastocele presenta una mayor extensión y se observa pigmento alrededor de los núcleos de las células animales. Las barras en A, B, C, D, E y F corresponden a 500 μm .

Figura 2. El arquenterón de *H. nexipus* se expande en la gástrula tardía. Morfología de la gástrula temprana, media, tardía y post-gástrula de *H. nexipus* (Estadios 10, 11, 12, 12.5, 13.5)

Figura 2. El arquenterón de *H. nexipus* se expande en la gástrula tardía. Morfología de la gástrula temprana, media, tardía y post-gástrula de *H. nexipus* (Estadios 10, 11, 12, 12.5, 13.5): A es una vista del lado dorsal del embrión. B, C, D y E son vistas posteriores y el lado dorsal está orientado hacia arriba. A la izquierda de cada embrión se encuentra el esquema que indica la orientación de las secciones que se muestran en F, G, H, I, J. (A) Vista externa de la gástrula temprana, estadio 10. (B) Vista externa de la gástrula temprana, estadio 11. (C) Vista externa de la gástrula media. (D) Vista externa de la gástrula tardía. (E) Vista externa de la post-gástrula. (F) Sección sagital de A. El hemisferio animal está orientado hacia arriba. Se observa el labio dorsal del blastoporo (ld) orientado a la derecha del embrión y el blastocele (bl) expandido. (G) Sección sagital de B. El hemisferio animal está orientado hacia arriba. Se observa el labio dorsal del blastoporo a la derecha y el labio ventral (lv) a la izquierda, se comienza a formar el arquenterón (a) cerca al labio dorsal. (H) Sección sagital de C. El hemisferio animal está orientado hacia arriba. Se observa el labio dorsal del blastoporo, el labio ventral, el arquenterón que comienza a alargarse y el blastocele que disminuye su tamaño. La flecha indica el cleft de Brachet. (I) Sección parasagital de D. El hemisferio animal está orientado hacia arriba. Se observa el labio dorsal, el labio ventral, el progreso de la expansión del arquenterón y la disminución del tamaño del blastocele. La flecha indica el cleft de Brachet. (J) La sección parasagital de E muestra al arquenterón en su extensión máxima y la presencia del collar circumblastoporal. Las barras en A, B, C, D, G, H e I corresponden a 500 μm y en E, F y J corresponden a 1000 μm .

Figura 3. El recubrimiento endodermal del Notocordio ocurre durante la Néurula. Morfología de los estadios de post-gástrula, néurula temprana, media y tardía de *H. nexipus* (Estadios 13, 14, 15, 16)

Figura 3. El recubrimiento endodermal del Notocordio ocurre durante la Néurula. Morfología de los estadios de post-gástrula, néurula temprana, media y tardía de *H. nexipus* (Estadios 13, 14, 15, 16): A, B, C y D son vistas dorsales con el lado rostral orientado hacia arriba. En la parte inferior izquierda de las secciones de cada embrión se encuentra el esquema que indica la orientación de las secciones que se muestran en E, F, G y H. (A) Vista externa de la post-gástrula. Se observa el blastoporo (bp). (B) Vista externa de la néurula temprana. Se observan la placa neural (pn), los pliegues neurales (pl) y el surco neural (sn). (C) Vista externa de la néurula media. Se observan los pliegues neurales y el surco neural. (D) Vista externa de la néurula tardía. Se observan los pliegues neurales fusionados. (E) En la sección transversal de la región rostral de A. Se observan el notocordio (n) expuesto, el mesodermo paraxial (mp), el ectodermo (e) y el recubrimiento endodermal (en). La flecha indica las crestas endodermales. (F) Sección transversal de la región rostral de B. Se observan el notocordio, el ectodermo, el mesodermo paraxial y el endodermo. (G) Sección transversal de la región media de C. Se observan el notocordio, el mesodermo paraxial y el endodermo. (H) Sección transversal de la región media de D. Se observan el notocordio y los somitas (s). Las barras en A, E, F, G y H corresponden a 500 μm y en B, C y D corresponden a 1000 μm

Figura 4. La formación de la yema de las branquias en *H. nexipus* comienza en el estadio 19. Morfología del estadio de yema de la cola, estadio de respuesta muscular y estadio de yema de las branquias de *H. nexipus* (Estadio 17, 18, 19):

Figura 4. La formación de la yema de las branquias en *H. nexipus* comienza en el estadio 19. Morfología del estadio de yema de la cola, estadio de respuesta muscular y estadio de yema de las branquias de *H. nexipus* (Estadio 17, 18, 19): A, C y E son vistas dorsales. B, D y F son vistas laterales. La región rostral está orientada hacia la izquierda en todas las imágenes. (A y B) Embrión en estadio de yema de la cola. En el embrión se observan arcos branquiales (ab), pronefros (pf) y la yema de la cola (yc). (C y D) Embrión en estadio de respuesta muscular. En el embrión se observan arcos branquiales, pronefros, somitas (s) y la yema de la cola. (E y F) Embrión en estadio de yema de las branquias. En el embrión se observan arcos branquiales, la yema de las branquias (yb), somitas y la yema de la cola. Las barras en A y B corresponden a 1000 μm y en C, D, E y F corresponden a 500 μm .

Figura 5. La ramificación de las branquias comienza en el estadio 20. Morfología de embriones en estadios de desarrollo de branquias de *H. nexipus* (Estadios 20, 21, 23)

Figura 5. La ramificación de las branquias comienza en el estadio 20. Morfología de embriones en estadios de desarrollo de branquias de *H. nexipus* (Estadios 20, 21, 23): A, C y E son vistas dorsales. B, D y F son magnificaciones de la cabeza. La región rostral está orientada hacia la izquierda en todas las imágenes. (A) En el embrión en estadio 20, se observan las ramas de las branquias (rb). La rama posterior (rp) no posee ramificaciones. (B) La magnificación de la cabeza de un embrión en estadio 20 muestra el estomodeo (so) y la rama anterior (ra) de la branquia que presenta 8 ramificaciones. (C) En el embrión en estadio 21, se observan las ramas de las branquias con una mayor extensión, la rama posterior no presenta ramificaciones. (D) La magnificación de la cabeza de un embrión en estadio 21 muestra la rama anterior de la branquia con 10 ramificaciones. (E) En el embrión en estadio de máximo desarrollo de branquias se observan las ramas de las branquias totalmente extendidas. (F) La magnificación de la cabeza de un embrión en estadio 23 muestra el estomodeo, la rama anterior que presenta 10 ramificaciones y la rama posterior que presenta 3 ramificaciones. Las barras en A, B, C, D y E corresponden a 1000 μm y en F corresponde a 500 μm .

9. TABLAS

Tabla 1. Diámetro de los embriones de *Hyloxalus nexipus*.

Embriones (Estadio)	Diámetro (mm)
1 (st 7) ¹	2.5
2 (st 7)	2.6
3 (st7)	2.5
4 (st7)	2.5
5 (st 7)	2.6
6 (st 8)	2.5
7 (st 9)	2.5
Promedio	2.52
Desv. Estándar	0.048

¹Estadio en el que fueron medidos los diámetros de los embriones

Tabla 2. Tabla del desarrollo, en horas y minutos, de los embriones de *Hyloxalus nexipus* en cada postura obtenida.

Postura	Hn-001¹	Hn-002	Hn-003	Hn-004	Hn-005
Fecha inicio	07/08/2014	14/08/2014	30/09/2014	28/01/2015	29/05/2015
Fecha eclosión		27/08/2014			11/06/2015
Estadio					
7	00:00 ²				
8	17:00			00:00	
9			00:00	6:00	
10			1:15	18:00	
11			5:15	22:00	00:00
12			10:00	25:45	4:00
12.5			14:30	35:00	13:00
13		00:00	35:15	53:30	32:00
14		10:35	45:30	56:00	39:00
15		14:35	49:30	64:00	52:00
16		17:50	54:20	68:00	57:00
17		26:05		90:00	67:30
18		52:05	73:00	96:00	
19		72:05	93:30		97:00
20		87:00			
21		121:05			
22		136:05			
23		162:05	150:30		
25		307:45			312:00
Tiempo en días		12.81			13

¹Hn y un número de 3 cifras representa la codificación de la postura Hn-001 = *Hyloxalus nexipus*, primera postura

²El tiempo 0:00 es el inicio de las observaciones.

Tabla 3. Tabla de tiempos de gastrulación, en horas y minutos, de los embriones de *Hyloxalus nexipus*

	Estadio	Tiempo (Horas)
Inicio de la gastrulación	10	0:00 ¹
	11	4:00
	12	8:15
	12,5	15:15
Final de la gastrulación	13	34:00
Tiempo de Gastrulación (Días)²		1.4

¹El tiempo 0:00 es el inicio de las observaciones.

²Tiempo de gastrulación en días: Calculado a partir del promedio de los tiempos de gastrulación de los embriones de cada postura

10.ANEXOS

Anexo 1. Tabla de posturas obtenidas de *Hyloxalus nexipus*.

Codificación de la postura	Fecha de encuentro de la postura	Estadio	Número de embriones
Hn-001 ¹	07/08/2014	7	15
Hn-002	14/08/2014	13	15
Hn-003	30/09/2014	9	15
Hn-004	28/01/2015	8	14
Hn-005	29/05/2015	11	15
		Total	74
		Promedio	14.8

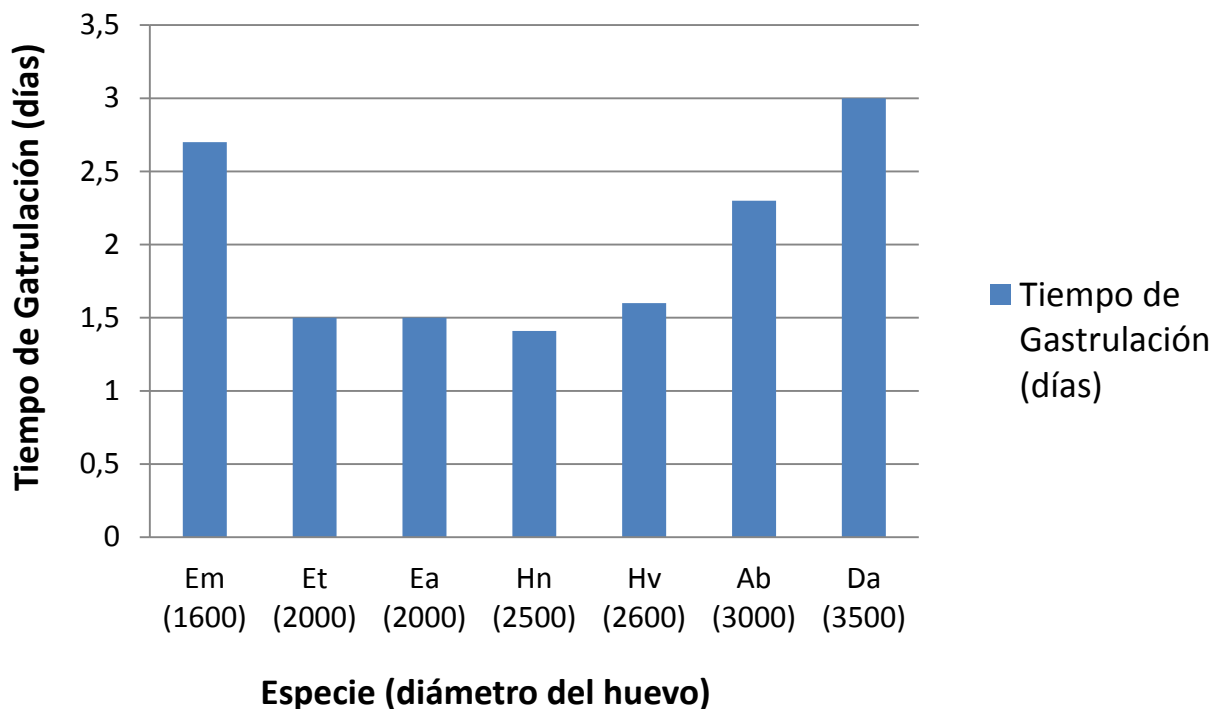
¹Hn y un número de 3 cifras representa la codificación de la postura Hn-001 = *Hyloxalus nexipus*, primera postura.

Anexo 2. Tabla del desarrollo de *Hyloxalus nexipus*. Tabla homologada a la tabla del desarrollo descrita para *Epipedobates machalilla* (E) (modificado de del Pino *et al.*, 2004). Se compara con los estadios del desarrollo descritos para *Xenopus laevis* (X) (Nieuwkoop y Faber, 1994) y con la tabla del desarrollo generalizada para anuros (G) (Gosner, 1960).

Tabla del desarrollo de <i>Hyloxalus nexipus</i> en comparación con <i>E. machalilla</i>				
Estadio				Características del desarrollo de <i>H. nexipus</i>
H	E	X	G	
1	1	1	1	Fertilización
2	2	2	3	Estadio de 2 células
3	3	3	4	Estadio de 4 células
4	4	4	5	Estadio de 8 células
5	5	5	6	Estadio de 16 células
6	6	6	7	Estadio de 32 células
7	7	7	8	Blástula de células grandes
8	8	8	8	Blástula de células pequeñas
9	9	9	9	Blástula avanzada
10	10	10	10	Gástrula temprana. El labio dorsal del blastoporo se forma
11	11	11	11	Gástrula media con un tapón de yema que mide alrededor de medio diámetro del embrión
12	12	12	12	Gástrula tardía con un tapón de yema que mide alrededor de un tercio del diámetro del embrión o menos.
13	13	13	13	Estadio de cierre del blastoporo. La placa neural se hace evidente en el estadio 13 avanzado
14	14	14	14	Estadio de néurula temprana
15	15	16	15	Estadio de néurula media

16	16	20	16	Estadio de néurula tardía. Formación del tubo neural
17	17	24	17	Estadio de yema de la cola. La cabeza y la yema de la cola sobresalen de la yema.
18	18	26	18	Estadio de respuesta muscular. Los arcos branquiales sobresalen de la cabeza
19	19	33	19	El corazón late. Las yemas de las branquias son visibles
20	20	40	20	Circulación de las branquias. Las branquias comienzan a ramificarse. Rama anterior 8 ramificaciones
21	21	41	21	La rama anterior de las branquias posee 10 ramificaciones. La rama posterior no se ramifica. La cola empieza a elongarse
22	22	41	22	Las branquias se alargan. Comienza la circulación en la cola
23	23	43	23	Las branquias adquieren su máxima extensión. La rama anterior posee 10 ramificaciones y la posterior 3 ramificaciones
25	25	45	25	Eclosión del renacuajo

Comparación Tiempos de Gastrulación



Anexo 3. Los tiempos de gastrulación son variables entre especies de la familia Dendrobatidae. En el gráfico de barras se muestra la comparación de los tiempos de gastrulación entre 7 especies de Dendrobatidos. En el eje X se encuentran las especies de dendrobatidos. Entre paréntesis están los diámetros de los huevos en micras. Em: *Epipedobates machalilla*, Et: *Epipedobates tricolor*. Ea: *Epipedobates anthonyi*, Hn: *Hyloxalus nexipus*, Hv: *Hyloxalus vertebralis*, Ab: *Aameerega bilinguis*, Da: *Dendrobates auratus*. El eje Y representa el tiempo de gastrulación en días, desde la formación del labio dorsal del blastoporo hasta el cierre del blastoporo. Em y Et = (del Pino *et al.*, 2004); Ea y Ab= (Montenegro & del Pino 2011); Hv y Da= (Hervas *et al.*, 2015); Hv= Este trabajo.

Anexo 4. Tabla de estrategias reproductivas, tamaño de huevo y tiempo de gastrulación de diferentes familias de ranas.

Especie	Modo de Reproducción	Diametro de huevo (mm)	Tiempo de gastrulación	Referencia Bibliografica
Pipidae				
<i>Xenopus laevis</i>	Acuático	1.2	5 horas	del Pino <i>et al.</i> , 2007
Leptodactylidae				
<i>Engystomops randi</i>	Nidos de espuma	1.1	12.5 horas	Romero-Carvajal <i>et al.</i> 2009
<i>Engystomops coloradorum</i>	Nidos de espuma	1.3	12.5 horas	
Centrolenidae				
<i>Hyalinobatrachium fleischmanni</i>	Bajo las hojas	2.1	24 horas	Salazar- Nicholls & del Pino, 2015
<i>Espadarana callistomma</i>	Sobre las hojas	2.1	23 horas	
Dendrobatidae				
<i>Epipedobates machalilla</i>	Nidos terrestres	1.6	2.7 días	del Pino <i>et al.</i> 2004
<i>Epipedobates anthonyi</i>	Nidos terrestres	2	1.5 días	Montenegro & del Pino 2011
<i>Epipedobates tricolor</i>	Nidos terrestres	2	1.5 días	del Pino <i>et al.</i> 2004
<i>Hyloxalus nexipus</i>	Nidos terrestres	2.5	1.4 días	
<i>Hyloxalus vertebralis</i>	Nidos terrestres	2.6	1.6 días	Hervas <i>et al.</i> , 2015
<i>Ameerega bilinguis</i>	Nidos terrestres	3	2.3 días	del Pino <i>et al.</i> , 2007
<i>Dendrobates auratus</i>	Nidos terrestres	3.5	3 días	Hervas <i>et al.</i> , 2015
Hemifractidae				
<i>Gastrotheca riobambae</i>	Incubación de embriones en marsupio	3	7 días	del Pino 1996; Moya <i>et al.</i> , 2007

GASTRULATION PATTERNS

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

1. *Xenopus / Engystomops*

Involution	
Arch. elongation	
Nt. elongation	

2. *Dendrobatids / E. coqui*

Involution	
Arch. elongation	
Nt. elongation	

3. *Gastrotheca*

Involution	
Arch. elongation	
Nt. elongation	

Anexo 5. Patrones de Gastrulación en ranas: Tres patrones de gastrulación se han encontrado de acuerdo con la velocidad del desarrollo y el tiempo en el que ocurren los procesos. Las barras indican que el comienzo de la involución elongación del arquenterón y notocordio en cada patrón (tomado de del Pino et al., 2007).

Anexo 6: Filogenia de la familia Dendrobatidae. En color verde, lila y rosado, los clados con representantes ya estudiados en el laboratorio de Biología del desarrollo. En color anaranjado el clado de dendrobátidos sin representantes estudiados. Las especies cuyo desarrollo ya ha sido analizado morfológicamente se encuentran resaltadas con color amarillo (Modificado de: Pyron & Wiens, 2011).

Anexo 7. El número de ramificaciones de las branquias es propio de cada especie. Comparación de las ramificaciones de las branquias en el estadio de máximo desarrollo de branquias en 5 especies de Dendrobatidos: (A) Esquema de las branquias en *Hyloxalus nexipus*. Rama anterior presenta 10 ramificaciones, rama posterior posee 3 ramificaciones. (B) Esquema de las branquia de *Epipedobates machalilla*. Rama anterior presenta 6 ramificaciones. (C) Esquema de las branquias de *Epipedobates tricolor*. Rama anterior posee 8 ramificaciones. (D) Esquema de las branquias de *Hyloxalus vertebralis*. La rama anterior posee 8 ramificaciones, la rama posterior no se ramifica. (E) Esquema de las branquias de *Dendrobates auratus*. La rama anterior presenta 9 ramificaciones y la rama posterior 2 ramificaciones. Las barras en A, B, C, D y E corresponden a 500 μ m aproximadamente. A= Este estudio. B y C = (del Pino *et al.*, 2004). D y E= (Hervas *et al.*, 2015)

Anexo 8. Lista de Fotografías y Créditos

Figura	Negativo	Especie	Iluminación	Fecha	Crédito
1A	SNAP-120554-0020	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	21/10/2014	J. Contreras
1B	Img-868	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	11/09/2015	J. Contreras
1C	SNAP-123517-0032	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	21/10/2014	J. Contreras
1D	SNAP-111942-0007	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	06/11/2014	J. Contreras
1E	Img-858	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	11/09/2015	J. Contreras
1F	SNAP-110445-0003	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	06/11/2014	J. Contreras
2A	SNAP-154405-0007	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	30/01/2015	J. Contreras
2B	Img-43	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	04/06/2015	J. Contreras
2C	Img-160	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	29/06/2015	J. Contreras
2D	Img-174	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	29/06/2015	J. Contreras
2E	Img-247	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	09/07/2015	J. Contreras
2F	Img-372	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	25/07/2015	J. Contreras
2G	Img-111	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	10/06/2015	J. Contreras
2H	Img-415	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	25/07/2015	J. Contreras

Anexo 8. Continuación

Figura	Negativo	Especie	Iluminación	Fecha	Crédito
2I	Img-425	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	25/07/2015	J. Contreras
2J	Img-520	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	25/07/2015	J. Contreras
3A	Img-200	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	29/06/2015	J. Contreras
3B	Img-276	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	25/07/2015	J. Contreras
3C	Img-322	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	25/07/2015	J. Contreras
3D	Img-333	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	25/07/2015	J. Contreras
3E	Img-498	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	25/07/2015	J. Contreras
3F	Img-533	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	25/07/2015	J. Contreras
3G	Img-545	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	25/07/2015	J. Contreras
3H	Img-557	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	25/07/2015	J. Contreras
4A	Img-351	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	25/07/2015	J. Contreras
4B	Img-357	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	25/07/2015	J. Contreras
4C	SNAP-122220-0013	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	23/09/2014	J. Contreras
4D	SNAP-122704-0015	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	23/09/2014	J. Contreras

Anexo 8. Continuación

Figura	Negativo	Especie	Iluminación	Fecha	Crédito
4E	SNAP-134402-0010	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	19/10/2014	J. Contreras
4F	SNAP-133412-0006	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	19/10/2014	J. Contreras
5A	SNAP-140911-0019	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	19/10/2014	J. Contreras
5B	SNAP-141232-0022	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	19/10/2014	J. Contreras
5C	SNAP-170425-0011	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	20/10/2014	J. Contreras
5D	SNAP-174136-0043	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	20/10/2014	J. Contreras
5E	SNAP-142215-0002	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	13/10/2014	J. Contreras
5F	SNAP-144221-0012	<i>H. nexipus</i>	Luz Directa	13/10/2014	J. Contreras