

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Caracterización de glándulas de eclosión en *Gastrotheca riobambae*

(Hemiphractidae)

Disertación previa a la obtención del título de Bióloga

IVANNA BRUNELLA CASTILLO VILLALBA

Quito, 2023

A mi “mare” y a mi hermano

Caracterización de glándulas de eclosión en *Gastrotheca riobambae*

(Hemiphractidae)

Characterization of hatching gland cells in *Gastrotheca riobambae* (Hemiphractidae)

Autores: Ivanna C. Villalba^{1*} y Andrés Romero Carvajal^{1**}

¹Escuela de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

*ibcastillo@puce.edu.ec

**maromero@puce.edu.ec

RESUMEN

El clado de los anuros es un grupo con gran diversidad de estrategias reproductivas. Algunas ranas comparten un mecanismo de eclosión mediado por una enzima proteolítica, que es producida en glándulas unicelulares de la epidermis. Esta enzima es capaz de digerir la membrana vitelina y la gelatina para facilitar la liberación de los renacuajos. La información que se tiene sobre las glándulas de eclosión (HGC) y la enzima de eclosión (HE) cubre aspectos morfológicos, funcionales y moleculares, pero abarca solo unas cuantas especies en ciertas familias. En este estudio se realiza la primera descripción de HGC en la familia Hemiphractidae, en *Gastrotheca riobambae*, que se caracteriza por tener un cuidado parental complejo. A través de inmunohistoquímica y microscopía electrónica de barrido (SEM) se pudo detectar la expresión de HE y observar el patrón de distribución y morfología de HGC en embriones en estadio 25. No obstante, la densidad de células observadas no concordaba en las dos técnicas, posiblemente por la liberación de la enzima y degeneración de las glándulas una vez ocurre la eclosión.

PALABRAS CLAVE: Anura, cuidado parental, enzima de eclosión, *Gastrotheca riobambae*, glándulas de eclosión.

ABSTRACT

The anuran clade has a great diversity of reproductive modes. Some frogs share a hatching mechanism mediated by a proteolytic enzyme produced in unicellular glands of the epidermis. The enzyme is capable of digesting the vitelline membrane and egg jelly to facilitate the release of tadpoles. The information available on hatching glands (HGC) and hatching enzyme (HE) covers morphological, functional and molecular aspects, described from only a few species in certain families. This study is the first description of HGC made in the family Hemiphractidae in *Gastrotheca riobambae*, characterized by complex parental care. Through immunohistochemistry and scanning electron microscopy (SEM) it was possible to detect HE expression and to observe the distribution pattern and morphology of HGC in stage 25 embryos. However, the density of cells observed in the two techniques did not coincide, possibly due to the release of the enzyme and degeneration of the glands once hatching occurs.

KEYWORDS: Anuran, *Gastrotheca riobambae*, hatching enzyme, hatching gland cells, parental care.

INTRODUCCIÓN

Los huevos de los anuros están rodeados por estructuras de origen materno, la membrana vitelina y gelatina, que funcionan como barreras protectoras, permiten el desarrollo embrionario y facilitan el intercambio de gases (Salthe, 1963). La gelatina consiste en varias capas de glicoproteínas globulares y fibrosas, las cuales se organizan de formas distintas según la especie y, además, determinan el grosor y apariencia física del huevo dentro del agua o en tierra (Altig y McDiarmid, 2007).

La eclosión normalmente ocurre cuando el desarrollo del embrión llega a un límite y tiene que cambiar a otra etapa de su historia de vida (Altig y McDiarmid, 2007). No obstante, los factores abióticos y bióticos pueden inducir la eclosión con el fin de asegurar la supervivencia (Warkentin, 2011a). Si las condiciones ambientales son desfavorables el embrión puede retrasar la eclosión. Por otro lado, la presencia de un depredador o patógeno, así como el abandono de los padres, pueden acelerar la eclosión para evitar la mortalidad de toda la postura (Delia et al., 2019; Martin, 1999; Touchon et al., 2006).

Los mecanismos de eclosión provocan la ruptura de las membranas de protección debido a acciones mecánicas, como el movimiento de los embriones, lluvia, ósmosis y el movimiento de los progenitores (Altig y McDiarmid, 2007; Downie et al., 2013; Warkentin, 2011a). Por ejemplo, en dos especies del género *Ranitomeya* (Dendrobatidae), los padres manipulan el saco vitelino y la gelatina con las patas traseras, para sacar los renacuajos y transportarlos; posiblemente la interacción da una señal para que ocurra la eclosión o esta se daría por la fuerza (Brown et al., 2008; Warkentin, 2011b). Por otro lado, también existe el mecanismo químico, que debilita, especialmente, la gelatina por una degradación localizada ocasionando la formación de un “bleb” o burbuja (Altig y McDiarmid, 2007; Yoshizaki, 1978). Las glándulas de eclosión (HGC) son

estructuras transitorias embrionarias que producen las proteasas que disuelven la gelatina y facilitan la eclosión (Altig y McDiarmid, 1999). Por ejemplo, en *Xenopus laevis* (Pipidae), la expresión de la enzima de eclosión (HE) empieza en el estadio 22 (Yoshizaki, 1973; Yoshizaki y Katagiri, 1975) y el movimiento del embrión terminan de lisar la última capa de gelatina y este se libera (Carroll y Hedrick, 1974).

Las HGC son células grandes en forma de botella, que empiezan a diferenciarse en la epidermis de la parte frontal de los embriones después de la neurulación (Yoshizaki, 1973). En algunas especies, son visibles desde el estadio 19 (Yamasaki et al., 1990) y en otras, son capaces de almacenar HE y secretarla para escapar de amenazas (Cohen, 2017; Cohen et al., 2016, 2019).

El patrón de distribución de las HGC se extiende desde el hocico hasta el dorso. Un estudio, comparó 20 especies de 6 familias diferentes de anuros (Bufonidae, Pipidae, Hylidae, Leptodactylidae, Microhylidae y Ranidae) y se describió un patrón general de distribución de HGC en la superficie de la cabeza y en la línea media dorsal, con las respectivas variaciones entre las diferentes especies (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007). Por otro lado, también se ha probado la funcionalidad de las HGC entre los estadios 19-25 aplicando estímulos mecánicos en dendrobátidos y centrolénidos para entender la plasticidad de la eclosión con este mecanismo (Flores, 2022; Zurita, 2020). Sin embargo, no existe información detallada sobre HGC ni HE en especies con un cuidado parental complejo como *Gastrotheca*.

El cuidado parental ha evolucionado múltiples veces en anfibios. En la familia Hemiphractidae, la madre se encarga de proteger los huevos y los transporta sobre su dorso (Wells, 2007). En cuatro de los seis géneros los huevos van pegados a la espalda y expuestos al exterior. Por otro lado, en los otros dos géneros son incubados dentro de un marsupio (del Pino, 2018).

Dentro de este grupo, se encuentra *Gastrotheca riobambae* (Fowler, 1913) que se destaca por la incubación y aislamiento prolongado de los huevos y la liberación de renacuajos exotróficos al cabo de 76-120 días (del Pino, 2019; W. E. Duellman y Maness, 1980). Al mismo tiempo, que los embriones de *G. riobambae* eclosionan dentro del marsupio en el estadio 25 (del Pino y Escobar, 1981), la madre introduce los dedos de las extremidades posteriores y abre la bolsa marsupial en el agua para que salgan (del Pino et al., 1975).

El propósito del siguiente estudio es complementar las investigaciones sobre los mecanismos de eclosión en Anuros, realizando la primera descripción de HGC y HE en *Gastrotheca riobambae* y en la familia Hemiphractidae. Para entender el proceso de eclosión y si los embriones cuentan con este medio bioquímico, se determinó la presencia, distribución y morfología por medio de inmunodetecciones y microscopía electrónica de barrido (SEM) en embriones en pre-eclosionados de aproximadamente 76-88 días, estadios 24-25 (del Pino y Escobar, 1981).

METODOLOGÍA

Obtención de embriones. - Los embriones de *Gastrotheca riobambae* fueron proporcionados por el Zoológico de Quito en los últimos estadios antes de la eclosión. Algunos embriones eclosionaron al manipular el marsupio de la madre para extraerlos, por lo que se almacenaron por separado del resto de embriones que seguían dentro de los huevos.

Fijación de embriones. – Los embriones fueron fijados siguiendo el protocolo de Flores (2022) . Los embriones dentro de los huevos fueron colocados en Steinberg 1X en una caja Petri sobre hielo para evitar cualquier movimiento al momento de retirar la membrana vitelina y la gelatina. Por el tamaño y la cantidad de embriones, estos se pasaron a tubos de centrífuga de 15

mL con Paraformaldehído 4% (PFA 4%). Para la Microscopía Electrónica de barrido (SEM) se separaron algunos embriones extraídos del huevo y se cambió el fijativo por Glutaraldehído 5% con PFA 2% en PBS 1X (Cohen et al., 2018). Todos los tubos se almacenaron a 4 °C.

Inmunotinción. – La inmunodetección indirecta requirió de un cambio gradual de los embriones fijados en PFA 4% a Metanol 100% (25 %, 50 %, 75 % y 100 %). Se los almacenó a 4 °C hasta hacer la tinción. A partir de este momento, el procedimiento se realizó en un embrión a la vez debido a la disponibilidad de individuos para probar el protocolo. Se realizó una rehidratación gradual con PBS 1X (Brivanlou y Harland, 1989), los lavados se hicieron cada 5 minutos (25 %, 50 %, 75 % y 100 %).

Siguiendo el protocolo utilizado por M. J. Salazar-Nicholls (comunicación personal, febrero 2023) se realizaron 5 lavados a temperatura ambiente en PBS 1X de 1 hora en movimiento constante y se almacenó por 24 horas a 4 °C. Al siguiente día, se realizó una primera impermeabilización del embrión con 5 lavados de PBS-Tr 0.5% de 1 hora en movimiento. Se refrigeró toda la noche y se repitió el proceso del día anterior. Al cuarto día, se hizo el recambio del embrión a la solución de bloqueo (Brivanlou y Harland, 1989) por una hora en movimiento para inhibir los sitios de unión inespecífica. Después se colocó al embrión en una solución de anticuerpo primario (O22, propiedad de Karen Warkentin) diluido en solución de bloqueo en una concentración 1:200. Se dejó reposar 1 hora, agitando ligeramente cada 10-15 minutos, antes de refrigerar por 72 horas. Posteriormente, se lavó el embrión 4 veces en movimiento con PBS-Tr 0.5 % por 10 minutos y luego, 2 veces por 20 minutos.

La manipulación del anticuerpo secundario (proporcionado por el Warkentin Lab) se realizó en oscuridad. Este fue diluido en solución de bloqueo en una proporción 1:500. Se colocó

el embrión en la nueva solución, se lo mantuvo a temperatura ambiente por 1 hora y se refrigeró por 24 horas. Finalmente, se realizaron lavados en PBS 1X en movimiento, 4 de 5 minutos y 2 de 10 minutos. Se puso DAPI en PBS 1X (1:1000) y se dejó en movimiento por 2 horas. Se lavó el embrión 2 veces con PBS 1X por 10 minutos. El pos-fijado se hizo con Formaldehído 4% en PBS 1X.

El embrión se montó en una tuerca sobre una caja Petri con un centro de vidrio en la base para tener mayor claridad. Se posicionó el embrión de manera dorsal y frontal. Se tapó el embrión con Formaldehído 4% en PBS 1X. Se observó en el microscopio ZEISS Axio Observer Z1 y se tomaron fotografías con la cámara Nikon DS-Qi2 y el programa NIS-Elements Imaging Software (Nikon, 2016).

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). – La microscopía, la liofilización y metalización de los embriones se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Caracterización de Nanomateriales de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE), siguiendo las modificaciones del protocolo de Guerra y Debut (2012) por Zurita (2020).

Se deshidrataron gradualmente dos embriones con Etanol 100% (30 %, 50 %, 50 %, 90 %, 100 % y 100 %), cada lavado se realizó por 20 minutos. Se refrigeraron a 4 °C por 24 horas. Se liofilizaron por 24 horas a -62 °C y a 1.2 Pa. Cada embrión se montó en un porta-muestras para SEM. Las muestras se colocaron ventralmente sobre un fragmento de punta de 10 µL, pegado a una cinta doble faz de carbono y sujeto con cinta de plata para poder angular dentro del microscopio. Posteriormente, se introdujeron en el metalizador Sputter Coating Quorum Q105R ES para la deposición de un recubrimiento de oro de 20 nm en 15 mA y 80 m Torr por 90 segundos. Por último, las muestras fueron observadas en un microscopio TESCAN MIRA3 FEG-SEM.

RESULTADOS

Se identificó la distribución de las glándulas de eclosión (HGC) en *Gastrotheca riobambae* a través inmunohistoquímica (Fig. 1-3). El embrión en estadio pre-eclosión, aproximadamente 24-25 (del Pino y Escobar, 1981), presentó la expresión de la enzima de eclosión (HE) en el rostro con un patrón bilateral (Fig. 1A). Las HGC se localizaron en el alrededor de los ojos (Fig. 1B, C, G). Además, el embrión presentó una cicatriz que comenzaba en la base del ojo derecho y se dirigía por la epidermis entre los ojos hasta la parte anterior del dorso. A esta zona el anticuerpo secundario para HE se unió inespecíficamente (Fig. 1A). Sobre las narinas se observó una línea curva con HGC continuas (Fig. 1F). También se observaron agrupaciones de HGC, algunas en pares (Fig. 1D, H) y otras en grupos en el dorso (Fig. 1E).

En el dorso las células marcadas con el anticuerpo para HE forman un parche (Fig. 2A). No siguen un patrón específico y están dispersas. Sin embargo, hay HGC concentradas en una línea cerca de la línea media (Fig. 2D). En esta línea las HGC están agrupadas en parches pequeños con una mayor densidad en la mitad (Fig. 2B, C, E, F). En la vista lateral, se observó que el parche se restringe al dorso y no se extiende ventralmente (Fig. 3). También es evidente la línea dorsal de HGC (Fig. 3B) y la dispersión de las glándulas (Fig. 3D). En el ojo habían más HGC en el contorno lateral (Fig. 3C) que lo que se detectaron en la zona frontal (Fig. 1B).

La morfología de las HGC fue diversa (Fig. 4). En la epidermis de la parte inferior del hocico, las glándulas eran polígonos irregulares con algunas células epidérmicas alrededor y sin microvellosidades (Fig. 4A). En la zona lateral del aparato bucal las HGC estaban hundidas eran triangulares (Fig. 4D). Cerca de las narinas las HGC tenían formas triangulares o poligonales con microvellosidades (Fig. 4B, E). Además, en la superficie tenían agujeros que corresponderían a las vesículas secretoras. En el contorno del ojo las HGC eran poligonales sin microvellosidades y

estaban cerca de los neuromastos (Fig. 4C). En el dorso no se pudieron observar la misma densidad de HGC vistas en la inmunodetección, estas también eran poligonales (Fig. 4F).

DISCUSIÓN

En anfibios, el cuidado parental ha evolucionado en varios taxones en los cuales ambos o un solo progenitor se encarga de proteger a los embriones (Warkentin, 2011b). Se ha observado que, a un mayor cuidado, los embriones eclosionan en estadios más tardíos. Mientras que, el abandono de los padres puede ocasionar la eclosión temprana como sucede en *Hyalinobatrachium fleischmanni* (Centrolenidae) (Delia et al., 2014). Además, es posible que los progenitores induzcan la eclosión o la provoquen directamente por manipulación física de la membrana vitelina y la gelatina (Brown et al., 2008; Warkentin, 2011b). Generalmente, después de salir del huevo los progenitores transportan los renacuajos del nido a fuentes de agua (Summers y Tumulty, 2014). En *Gastrotheca riobambae* (Hemiphractidae), las hembras incuban entre 81-207 huevos dentro de una bolsa marsupial, que se encuentra por debajo del integumento dorsal, por alrededor de 76-120 días (del Pino et al., 1975; W. E. Duellman y Maness, 1980). Los renacuajos eclosionan en el estadio 25 dentro del marsupio y se liberan directamente en el agua; pero los embriones tempranos no son capaces de escapar de una capa firme y delgada de gelatina, que puede estar compartida entre dos o más huevos (del Pino et al., 1975; del Pino y Escobar, 1981). Dentro del género, es común que las madres introduzcan los dedos de las extremidades posteriores para ayudar a los renacuajos a salir. Aunque el desarrollo es sincrónico, la eclosión de todos los individuos puede llevar un par de días, (del Pino et al., 1975; W. E. Duellman y Maness, 1980). Por este motivo, se estimó que los embriones utilizados en este estudio fueron fijados en el estadio 25 y, además, se separaron los que eclosionaron al momento de la extracción.

Las glándulas de eclosión (HGC) han sido reportadas en algunas familias de Anura desde el estadio 16-17 (Gosner, 1960), con morfologías variables y un patrón de distribución general en la superficie de la cabeza y en el tronco cerca de la línea media dorsal (Altig y McDiarmid, 1999; Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007). En *Xenopus laevis* (Pipidae), las glándulas aparecen en el estadio 18-19 (Nieuwkoop y Faber, 1994) desde la parte dorsal de la cabeza y a lo largo de la línea media dorsal, formando una Y (Drysdale y Elinson, 1991). En el estadio 22, las HGC tienen microvellosidades y comienzan a producir enzima de eclosión (HE) (Yoshizaki, 1973; Yoshizaki y Katagiri, 1975), lo que permite que haya una primera digestión de la gelatina y formación de un “bleb” (Carroll y Hedrick, 1974). En *Elachistocleis ovalis* (Microhylidae) en el estadio 23 y en Leptodactylidae las glándulas forman un parche en la frente de los embriones (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007). Por otro lado, en *Agalychnis callidryas* (Phyllomedusidae) en el estadio 17-18 (2 días) (Gosner, 1960) son visibles HGC pequeñas en el hocico y cerca de la línea media dorsal de la cabeza, en forma de T. Mientras que, a los 5 días, están concentradas alrededor de las narinas, sobre la boca y los ojos (Cohen, 2017; Cohen et al., 2016). Además, son capaces de almacenar la HE y tienen la capacidad de secretarla para escapar de amenazas (Cohen et al., 2019). Dentro de la misma familia, las HGC de *Phyllomedusa trinitatis* en embriones de 5-6 días, se localizan debajo de los nostrilos y con un rol menor en el mecanismo de eclosión que es dominado por efectos osmóticos y el movimiento de los embriones (Downie *et al.*, 2013).

En este estudio se identificó por inmunodetección que la expresión de enzima de eclosión (HE) tiene una distribución nueva, al menos para embriones en estadio 25, con una mayor concentración en el dorso del embrión. En el rostro de *G. riobambae* las HGC se encuentran alineadas sobre las narinas (Fig. 1F). Mientras que, en embriones en el mismo estadio de *Epipedobates tricolor* y *Hyloxalus nexipus* (Dendrobatidae) están acumuladas en el área de las

narinas y la boca (Zurita, 2020). Por otro lado, en *G. riobambae* las glándulas están alrededor de los ojos con una mayor concentración en el área posterior (Fig. 1B, 3C). Al contrario de *H. awa* (Dendrobatidae) que están aglomeradas en la parte ventral del ojo (Flores, 2022). Además, en *G. riobambae* hay pequeñas agrupaciones de HGC sobre la línea media dorsal (Fig. 2B-D) y un parche disperso en el tronco (Fig. 2A). En *Rana pirica* y *R. temporaria* (Ranidae), también ha sido descrita la distribución en parches cerca de la línea media dorsal desde el estadio 18 (Kitamura y Katagiri, 1998; Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007). Asimismo, en *E. anthonyi* (Dendrobatidae) la densidad de las HGC en el rostro disminuye en el estadio 25, pero se distinguen dos líneas paralelas a la línea media dorsal, con un parche intermedio (Flores, 2022). Cabe mencionar que la fluorescencia de la cicatriz (Fig. 1A-D, 2A, D), posiblemente se debió a la unión inespecífica del anticuerpo secundario a las células marginales, por una hipervariabilidad en la región del parátopo del anticuerpo, generando un nivel de mimetismo molecular (Ramos-Vara, 2005; Ward, 2004).

En la microscopía electrónica de barrido (SEM) se comprometió la integridad de los embriones de *G. riobambae* después de la liofilización, ya que se redujeron en tamaño y se arrugaron formando dobleces pronunciados. Esto dificultó la observación de ciertas zonas, pero se fotografiaron HGC entre células epidérmicos del área entre las narinas y la boca, alrededor de los ojos y en el dorso, aunque la parte anterior era la más afectada por los pliegos (Fig. 4). La morfología de las HGC en microscopía electrónica es reconocida por la apariencia de la superficie apical, esta puede tener microcrestas, microvellosidades y vesículas secretoras. Además, estas células pueden desarrollarse en grupos que con el desarrollo se separan y en el momento de eclosionar empiezan a degenerarse (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007). En *G. riobambae* en la zona lateral del aparato bucal, las HGC eran triangulares, con la superficie deprimida (Fig. 4D), en la parte inferior del hocico eran poligonales irregulares sin microvellosidades, pero con crestas

pequeñas (Fig. 4A). También en el contorno superior de los ojos, las HGC se encontraron sobre los neuromastos de la línea lateral y eran poligonales irregulares sin microvellosidades (Fig. 4C). En dendrobátidos en estadio 25 se ha identificado dentro de una misma área, HGC triangulares, poligonales y elípticas sin microvellosidades. Mientras que, en *Espadarana prosoblepon* (Centrolenidae) se diferencian en células redondas con microvellosidades en la parte frontal y poligonales con microvellosidades en el dorso (Flores, 2022). Por otro lado, las HGC de las narinas tenían una mezcla de dos morfologías. Algunas eran triangulares y eran visibles los agujeros de vesículas secretoras en el ápice (Fig. 4B). Junto a estas había estructuras circulares pronunciadas o HGC poligonales con microvellosidades (Fig. 4B, E). Estas últimas son similares a las HGC de *Dendropsophus ebraccatus* (Hylidae) con microvellosidades cortas y su distribución continua que ocurren en embriones de estadio 18-22 (Cohen et al., 2018).

Aunque en la inmunodetección la presencia de HGC era abundante en el parche dorsal y línea media, en SEM no fue posible identificar las glándulas poligonales ni de otras morfologías en la misma densidad (Fig. 4F). La morfología poligonal se ha visualizado en la línea media dorsal de *Dendropsophus microcephalus* (Hylidae) en estadios 18-20 (Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007). No obstante, difiere de *Hyalinobatrachium orientale* (Centrolenidae) (Nokhbatolfoghahai et al., 2015) y *Bufo japonicus* (Bufonidae) (Yamasaki et al., 1990), donde las HGC dorsales a partir del estadio 20 son pequeñas y tienen microvellosidades. Esta falta de HGC puede deberse a que después de la eclosión tienden a desaparecer gradualmente para el estadio 26 (Kitamura y Katagiri, 1998; Nokhbatolfoghahai y Downie, 2007). Por ejemplo, en embriones de Dendrobatidae eclosionados ya no se visualizan glándulas de eclosión (Zurita, 2020).

En conclusión, esta primera descripción muestra que las HGC de *Gastrotheca riobambae* (Hemiphractidae) tienen una distribución en la zona frontal que difiere con las descripciones

realizadas en otras familias. No obstante, el patrón visualizado en el dorso es semejante a algunas especies con una distancia filogenética cercana como *E. anthonyi* (Dendrobatidae) y otras más distantes (Pipidae y Ranidae) (Castroviejo-Fisher et al., 2015; Duellman et al., 2016). Asimismo, la morfología poligonal tiene similitudes con glándulas en embriones de estadio 25 en Dendrobatidae, Hylidae y Centrolenidae. Por otro lado, debido a la falta de concordancia entre la densidad de células marcadas en la inmunohistoquímica y SEM, sería necesario estudiar la ontogenia de las HGC y el posible rol que tienen las madres al manipular el marsupio.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre y mi hermano por apoyarme y acompañarme en todo el tiempo que estuve cursando la carrera y haciendo este trabajo de titulación. A mi tía por ayudarme a mantenerme en la carrera desde el inicio. Al Dr. Andrés Romero-Carvajal por permitirme formar parte del Laboratorio de Biología del Desarrollo y brindarme su apoyo en el trabajo de titulación. A todos los que forman parte del laboratorio por guiarme y hacerme disfrutar de la investigación dentro de un laboratorio. A Daniela Flores por ayudarme con la fijación de los embriones. A María José Salazar Nicholls y al Warkentin Lab por proporcionarnos los anticuerpos y el protocolo para la inmunohistoquímica. Agradezco al Laboratorio de Caracterización de Nanomateriales de la ESPE por permitirme realizar la microscopía electrónica. Al Zoológico de Quito por proporcionar los embriones para este estudio. A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento para poder realizar este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altig, R., y McDiarmid, R. (1999). Body-plan development and morphology. En *Tadpoles: The Biology of Anuran larvae* (pp. 24–51). University of Chicago Press.
- Altig, R., y McDiarmid, R. W. (2007). Morphological diversity and evolution of egg and clutch structure in amphibians. *Herpetological Monographs*, 21, 1–32.
<https://www.jstor.org/stable/40205456>
- Brivanlou, A. H., y Harland, R. M. (1989). Expression of an engrailed-related protein is induced in the anterior neural ectoderm of early *Xenopus* embryos. *Development*, 106, 611–617.
<https://doi.org/10.1242/dev.106.3.611>
- Brown, J. L., Twomey, E., Morales, V., y Summers, K. (2008). Phytotelm size in relation to parental care and mating strategies in two species of Peruvian poison frogs. *Behaviour*, 145(9), 1139–1165. <https://doi.org/10.1163/156853908785387647>
- Carroll, E. J., y Hedrick, J. L. (1974). Hatching in the toad *Xenopus laevis*: Morphological events and evidence for a hatching enzyme. *Developmental Biology*, 38(1), 1–13.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(74\)90254-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(74)90254-1)
- Castroviejo-Fisher, S., Padial, J. M., Riva, I. D. La, Pombal, J. P., Da Silva, H. R., Rojas-Runjaic, F. J. M., Medina-Méndez, E., y Frost, D. R. (2015). Phylogenetic systematics of egg-brooding frogs (Anura: Hemiphraactidae) and the evolution of direct development. *Zootaxa*, 4004(1), 1–75. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4004.1.1>
- Cohen, K. L. (2017). *Anuran hatching mechanisms and their role in adaptive plasticity* [Universidad de Boston]. <https://open.bu.edu/ds2/stream/?#/documents/226746/page/1>
- Cohen, K. L., Piacentino, M. L., y Warkentin, K. M. (2018). The hatching process and mechanisms of adaptive hatching acceleration in hourglass treefrogs, *Dendropsophus*

embraccatus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 217, 63–74. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2017.10.020>

Cohen, K. L., Piacentino, M. L., y Warkentin, K. M. (2019). Two types of hatching gland cells facilitate escape-hatching at different developmental stages in red-eyed treefrogs, *Agalychnis callidryas* (Anura: Phyllomedusidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 126(4), 751–767. <https://doi.org/10.1093/BIOLINNEAN/BLY214>

Cohen, K. L., Seid, M. A., y Warkentin, K. M. (2016). How embryos escape from danger: The mechanism of rapid, plastic hatching in red-eyed treefrogs. *Journal of Experimental Biology*, 219(12), 1875–1883. <https://doi.org/10.1242/JEB.139519/VIDEO-3>

Delia, J., Ramírez-Bautista, A., y Summers, K. (2014). Glassfrog embryos hatch early after parental desertion. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1785). <https://doi.org/10.1098/RSPB.2013.3237>

Delia, J., Rivera-Ordóñez, J. M., Salazar-Nicholls, M. J., y Warkentin, K. M. (2019). Hatching plasticity and the adaptive benefits of extended embryonic development in glassfrogs. *Evolutionary Ecology*, 33(1), 37–53. <https://doi.org/10.1007/S10682-018-9963-2/METRICS>

del Pino, E. (2018). The extraordinary biology and development of marsupial frogs (Hemiphractidae) in comparison with fish, mammals, birds, amphibians and other animals. *Mechanisms of Development*, 154, 2–11. <https://doi.org/10.1016/J.MOD.2017.12.002>

del Pino, E. (2019). Embryogenesis of marsupial frogs (Hemiphractidae), and the changes that accompany terrestrial development in frogs. En W. Tworzydło y S. M. Bilinski (Eds.), *Evo-Devo: Non-model Species in Cell and Developmental Biology* (Vol. 68, pp. 379–418). Springer Nature Switzerland AG. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23459-1_16/COVER

- del Pino, E., y Escobar, B. (1981). Embryonic stages of *Gastrotheca riobambae* (Fowler) during maternal incubation and comparison of development with that of other egg-brooding hyloid frogs. *Journal of Morphology*, *167*(3), 277–295. <https://doi.org/10.1002/JMOR.1051670303>
- del Pino, E., Galarza, M., de Albuja, C., y Humphries, A. J. (1975). The maternal pouch and development in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae* (Fowler). *The Biological Bulletin*, *149*(3), 480–491. <https://doi.org/10.2307/1540381>
- Downie, J. R., Nokhbatolfoghahai, M., Bruce, D., Smith, J. M., Orthmann-Brask, N., y MacDonald-Allan, I. (2013). Nest structure, incubation and hatching in the Trinidadian leaf-frog *Phyllomedusa trinitatis* (Anura: Hyliidae). *Phyllomedusa*, *12*(1), 13–32. <https://doi.org/10.11606/ISSN.2316-9079.V12I1P13-32>
- Drysdale, T. A., y Elinson, R. P. (1991). Development of the *Xenopus laevis* hatching gland and its relationship to surface ectoderm patterning. *Development*, *111*(2), 469–478. <https://doi.org/10.1242/dev.111.2.469>
- Duellman, W. E., y Maness, S. J. (1980). The reproductive behavior of some hyloid marsupial frogs. *Journal of Herpetology*, *14*(3), 213–222. <https://doi.org/10.2307/1563542>
- Duellman, W., Marion, A., y Hedges, S. (2016). Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, *4104*(1), 1–109. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4104.1.1>
- Flores, D. (2022). *Mecanismo de eclosión de tres especies del orden Anura: Hyloxalus awa, Epipedobates anthonyi (Dendrobatidae) y Espadarana prosoblepon (Centrolenidae)* [Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <http://repositorio.puce.edu.ec:80/handle/22000/21362>

Fowler, H. W. (1913). Amphibians and reptiles from Ecuador, Venezuela, and Yucatan.

Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 65, 153–176.

<https://www.biodiversitylibrary.org/part/36060>

Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on

identification. *Herpetologica*, 16(3), 183–190. <https://doi.org/10.2307/3890061>

Guerra, S., y Debut, A. (2012). *Comparación entre cuatro protocolos para la preparación de*

muestras de referencia usando el Microscopio Electrónico de Barrido.

https://www.researchgate.net/publication/236874729_Comparacion_entre_cuatro_protocolos_para_la_preparacion_de_muestras_de_referencia_usando_el_Microscopio_Electronico_de_Barrido

Kitamura, Y., y Katagiri, C. (1998). Characterization of the hatching enzyme from embryos of an

anuran amphibian, *Rana pirica*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1387(1–2), 153–164. [https://doi.org/10.1016/S0167-](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00117-4)

4838(98)00117-4

Martin, K. L. M. (1999). Ready and waiting: delayed hatching and extended incubation of

anamniotic vertebrate terrestrial eggs. *Integrative and Comparative Biology*, 39(2), 279–288. <https://doi.org/10.1093/ICB/39.2.279>

Nieuwkoop, P. D., y Faber, J. (1994). *Normal table of Xenopus laevis (Daudin): A systematical*

and chronological survey of the development of the fertilized egg till the end of metamorphosis. Garland Science.

Nikon. (2016). *NIS-Elements software.*

https://www.microscope.healthcare.nikon.com/en_EU/products/software/nis-elements

- Nokhbatolfoghahai, M., y Downie, J. R. (2007). Amphibian hatching gland cells: Pattern and distribution in anurans. *Tissue and Cell*, 39(4), 225–240.
<https://doi.org/10.1016/J.TICE.2007.04.003>
- Nokhbatolfoghahai, M., Pollock, C. J., y Downie, J. R. (2015). Oviposition and development in the glass frog *Hyalinobatrachium orientale* (Anura: Centrolenidae). *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 14(1), 3–17. <https://doi.org/10.11606/ISSN.2316-9079.V14I1P3-17>
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*, 42, 405–426.
- Salthe, S. N. (1963). The egg capsules in the amphibia. *Journal of Morphology*, 113(2), 161–171. <https://doi.org/10.1002/JMOR.1051130204>
- Summers, K., y Tumulty, J. (2014). Parental Care, Sexual Selection, and Mating Systems in Neotropical Poison Frogs. En R. H. Macedo y G. Machado (Eds.), *Sexual Selection* (pp. 289–320). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416028-6.00011-6>
- Touchon, J. C., Gomez-Mestre, I., y Warkentin, K. M. (2006). Hatching plasticity in two temperate anurans: responses to a pathogen and predation cues. *Canadian Journal of Zoology*, 84(4), 556–563. <https://doi.org/10.1139/Z06-058>
- Ward, J. M. (2004). Controls for Immunohistochemistry: IS “Brown” Good Enough? En *Toxicologic Pathology* (Vol. 32, Issue 3, pp. 273–274).
<https://doi.org/10.1080/01926230490457585>
- Warkentin, K. M. (2011a). Environmentally cued hatching across taxa: embryos respond to risk and opportunity. *Integrative and Comparative Biology*, 51(1), 14–25.
<https://doi.org/10.1093/ICB/ICR017>

- Warkentin, K. M. (2011b). Plasticity of hatching in amphibians: Evolution, trade-offs, cues and mechanisms. *Integrative and Comparative Biology*, 51(1), 111–127.
<https://doi.org/10.1093/ICB/ICR046>
- Wells, K. D. (2007). *The ecology and behavior of amphibians*. University of Chicago Press.
- Yamasaki, H., Katagiri, C., y Yoshizaki, N. (1990). Selective degradation of specific components of fertilization coat and differentiation of hatching gland cells during the two phase hatching of *Bufo japonicus* embryos: toad/hatching gland cell/fertilization coat hydrolysis/hatching medium. *Development, Growth & Differentiation*, 32(1), 65–72.
<https://doi.org/10.1111/J.1440-169X.1990.00065.X>
- Yoshizaki, N. (1973). Ultrastructure of the hatching gland cells in the south african clawed toad, *Xenopus laevis*. *Journal of the Faculty of Science*, 18(4), 469–480.
https://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/27543/1/18%284%29_P469-480.pdf
- Yoshizaki, N. (1978). Disintegration of the vitelline coat during the hatching process in the frog. *Journal of Experimental Zoology*, 203(1), 127–133.
<https://doi.org/10.1002/JEZ.1402030112>
- Yoshizaki, N., y Katagiri, C. (1975). Cellular basis for the production and secretion of the hatching enzyme by frog embryos. *Journal of Experimental Zoology*, 192(2), 203–212.
<https://doi.org/10.1002/JEZ.1401920210>
- Zurita, D. (2020). *Caracterización del mecanismo de eclosión y la eclosión por estímulo en *Hyloxalus nexipus* y *Epipedobates tricolor* (Dendrobatidae)* [Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/18005>

FIGURAS

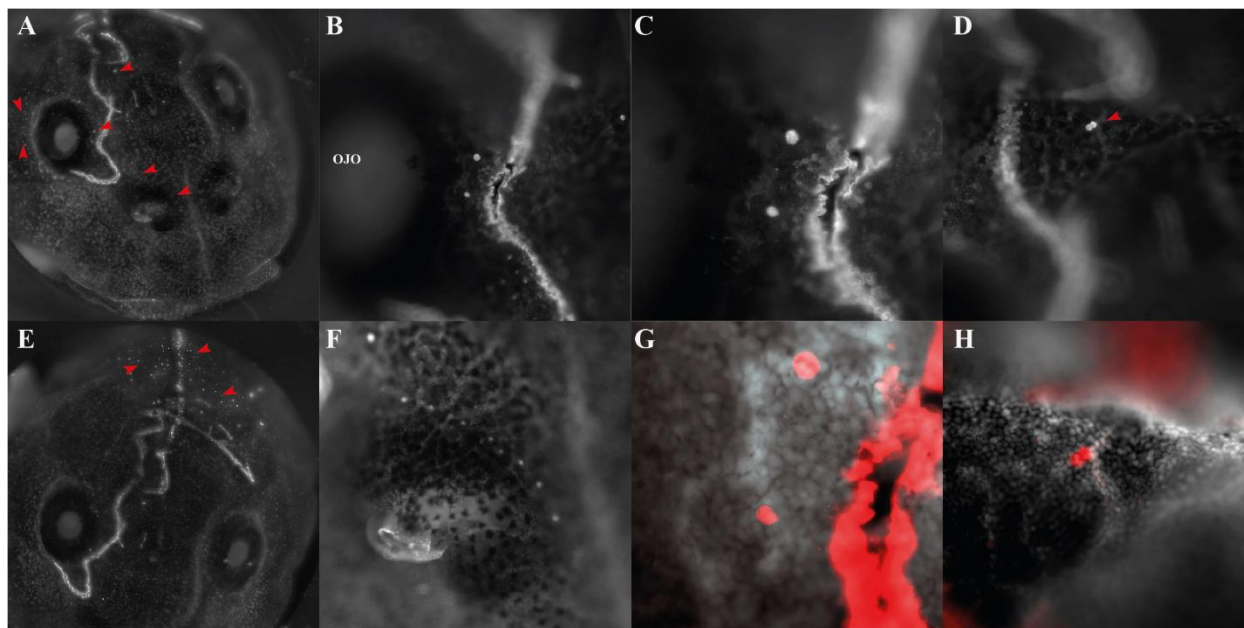


Figura 1. Vista frontal de las glándulas de eclosión (HGC) en *Gastrotheca riobambae*. Vista frontal de HGC en un embrión en un estadio (st) cercano a la eclosión, aproximadamente st 25. con tinción para enzima de eclosión (HE). Las flechas rojas señalan el sitio de expresión. (A) HGC en la parte frontal del embrión, alrededor de los ojos y sobre las narinas con un patrón bilateral. (B, C) Acercamiento al ojo derecho con HGC alrededor del ojo, también ocurrió la unión del anticuerpo a una cicatriz, que se extiende desde la parte inferior del ojo hacia el dorso. (D) Acercamiento a dos HGC cercanas entre sí en la parte superior del rostro. (E) Vista frontodorsal de HGC distribuidas en un parche. (F) Acercamiento una línea curva de HGC sobre la narina. (G, H) Tinción de HE + DAPI de las HGC.

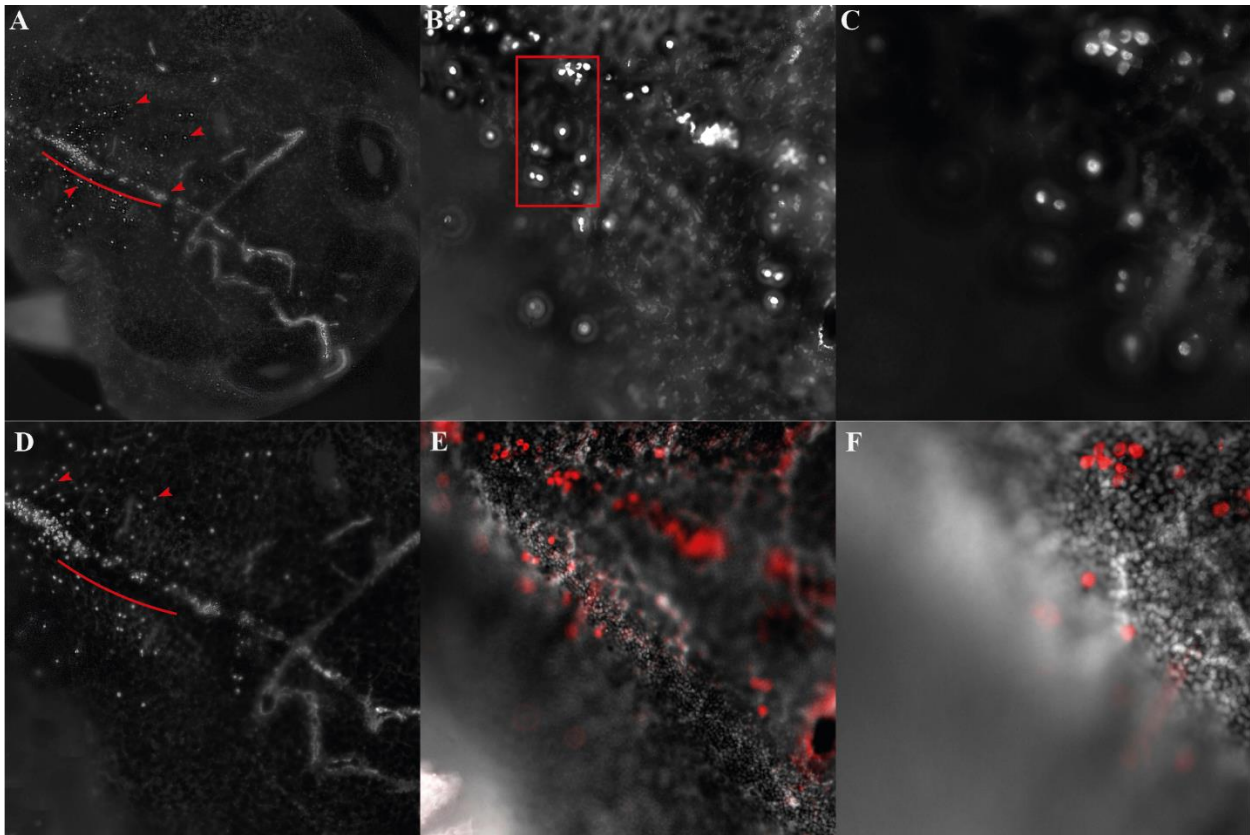


Figura 2. Vista dorsal de las glándulas de eclosión (HGC) en *Gastrotheca riobambae*. Las HGC tienen una distribución amplia en el dorso del embrión. (A, D) Las HGC se distribuyen en un parche en el dorso (flechas rojas). La línea roja indica una fila de HGC cerca de la línea media. (B) Acercamiento a la parte anterior de esta línea. (C) Acercamiento de la zona dentro del rectángulo rojo. (E, F) Tinción de HE + DAPI de las HGC.

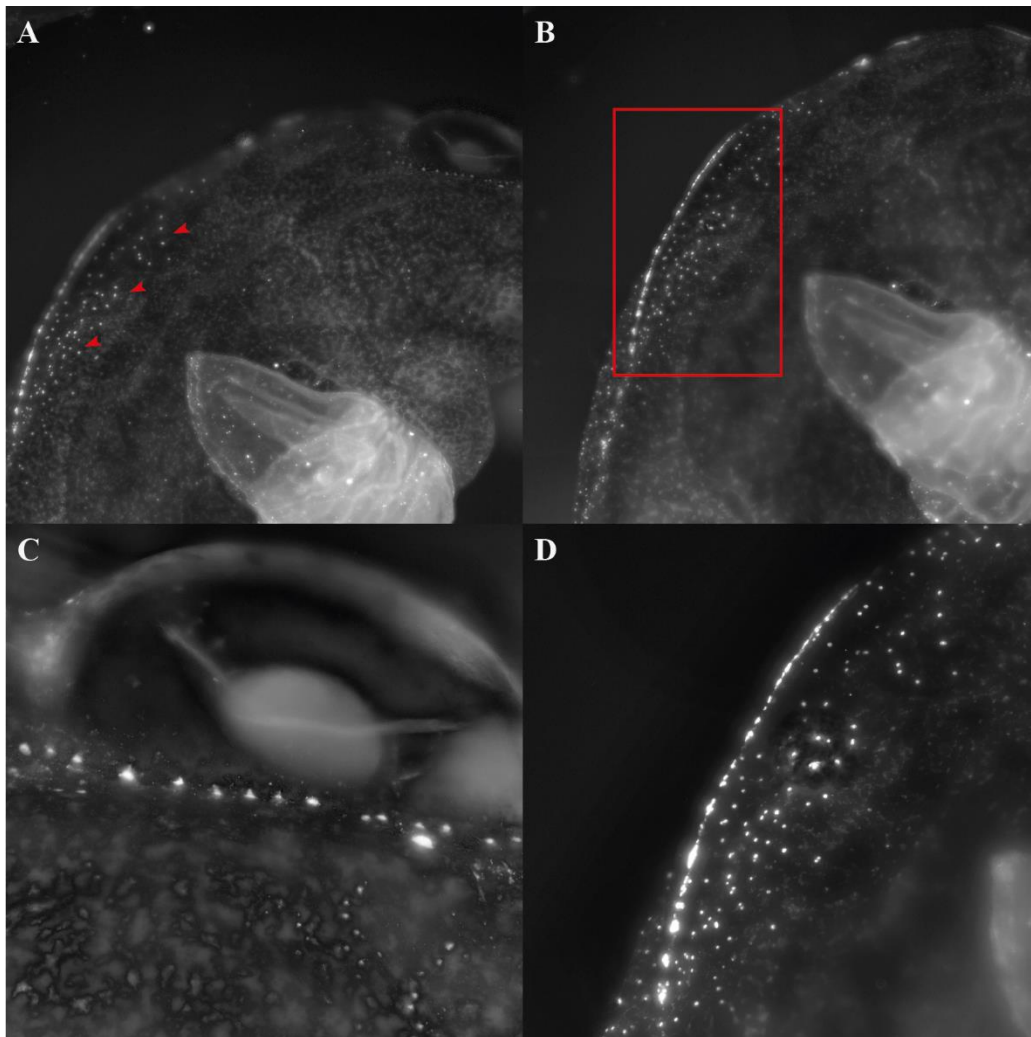


Figura 3. Vista lateral de las glándulas de eclosión (HGC) en *Gastrotheca riobambae*. (A) Vista lateral del parche dorsal de HGC (flechas rojas). (B) Encuadre de la línea dorsal de HGC. (C) Acercamiento a la fila continua de HGC en el contorno del ojo derecho. (D) Acercamiento del parche dentro del rectángulo rojo.

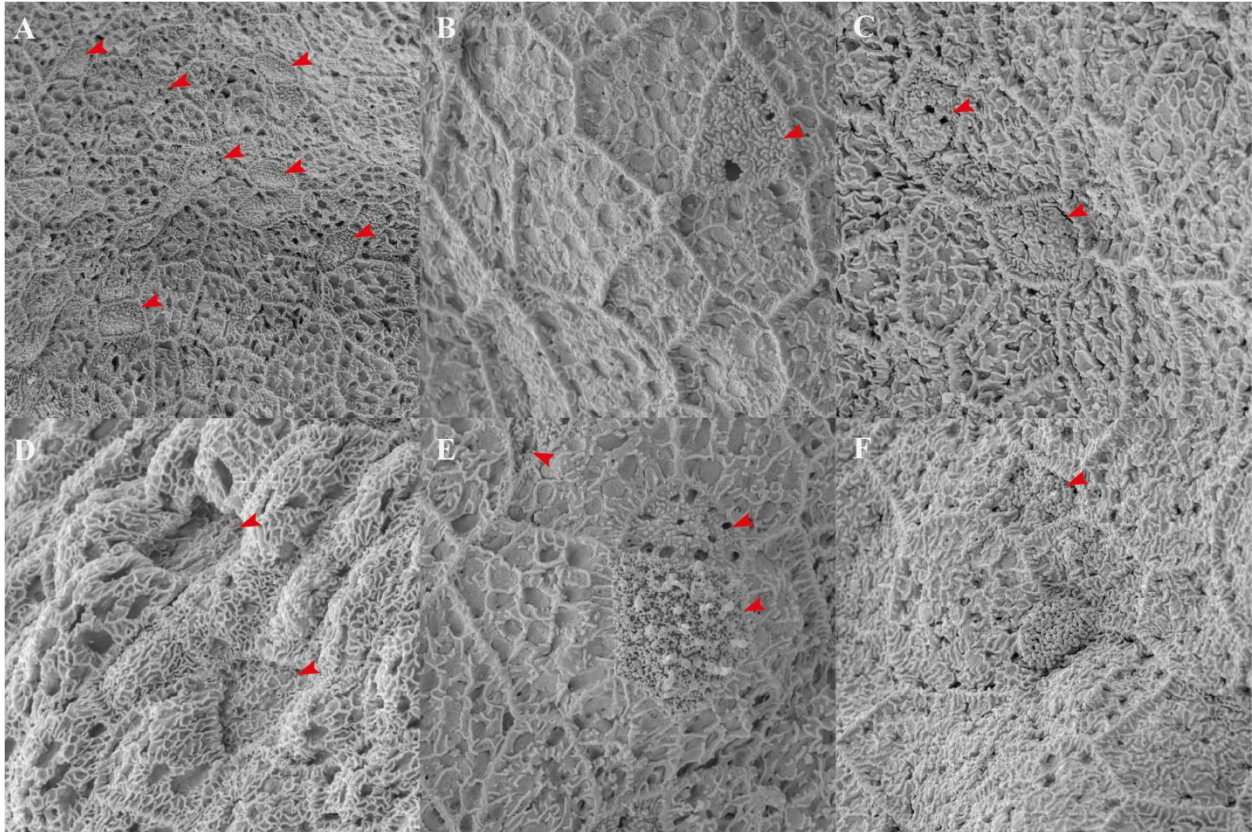


Figura 4. Morfología de las glándulas de eclosión (HGC) en *Gastrotheca riobambae*. Las HGC vistas en SEM. Las flechas rojas indican su posición. (A, D) HGC en la parte inferior del hocico con formas poligonales sin microvellosidades. (B, E) HGC en las narinas con diferentes morfologías. (C) HGC en el contorno de los ojos. (F) Una de las pocas HGC vistas en el dorso.