PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Desarrollo temprano desde la fertilización hasta la eclosión del renacuajo en la rana *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae)

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

ANA BELÉN CARRILLO VELÁSTEGUI

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 Ana Belén Carrillo Velástegui ha sido concluida en conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Andrés Romero-Carvajal

Director de la disertación

Quito, 24 de Noviembre de 2015

A Rosita Isabel

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado su guía y permitirme haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional. A mis padres, porque siempre representan el pilar más importante y por demostrarme su amor y apoyo incondicional en todas las áreas de mi vida; a mi hermana por su amor incansable y por aplaudir cada logro alcanzado.

A la Dra. Eugenia del Pino, por su visión crítica de muchos aspectos en la rama de la biología, por su rectitud en su profesión como docente y por sus consejos, que ayudan a formar como persona e Investigadora. A Andrés Romero-Carvajal por la disponibilidad, dirección, continuo apoyo y paciencia brindados durante esta etapa, que permitió que nuestras discusiones e intercambio de ideas, redunden benéficamente tanto a nivel científico como personal.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por la beca de investigación otorgada a la Dra. Eugenia del Pino. A Myriam Rivera y a la Iniciativa de Conservación "Balsa de los Sapos" por la colaboración con los especímenes donados.

Quiero agradecer también al equipo de Laboratorio, por su cariño, amabilidad y disponibilidad durante mi permanencia en su grupo; a Alex, Jenny, Chris y en especial a María José, por su motivación demostrada durante el desarrollo de este trabajo.

Finalmente a todos los que han formado parte de mi vida y han sido partícipes de este logro en mi carrera profesional.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN 12

2. ABSTRACT 13

3. INTRODUCCIÓN 14

4. MATERIALES Y MÉTODOS 21

4.1 OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS EMBRIONES 21

4.2 FIJACIÓN Y MANEJO DE LOS EMBRIONES 21

4.2.1 MANEJO DE LOS EMBRIONES 22

4.2.2 SOLUCIONES Y FIJATIVOS 21

4.2.3 FIJACIÓN DE LOS EMBRIONES 24

4.3 OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA INTERNA Y EXTERNA DE LOS EMBRIONES 25

4.3.1 BISECCIONES Y SECCIONES EN VIBRATOME 25

4.3.2 TINCIÓN FLUORESCENTE PARA NÚCLEOS 26

4.4 MEDICIONES Y MICROFOTOGRAFÍA DE EMBRIONES 26

5. RESULTADOS 27

5.1 DESARROLLO DE LOS EMBRIONES DE *Agalychnis spurrelli* 27

5.2 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LOS EMBRIONES DE *A. spurrelli* 28

5.2.1 EL CLIVAJE DE *A. spurrelli* ES IRREGULAR E INCOMPLETO 28

5.2.2 EL BLASTOCELE ESTÁ AUSENTE EN LA BLÁSTULA TEMPRANA Y MEDIA DE *A. spurrelli* 29

5.2.3 EL BLASTOCELE SE FORMA EN LA BLÁSTULA TARDÍA DE *A. spurrelli* 30

5.2.4 EL BLASTOCELE ES DE TAMAÑO REDUCIDO EN LA GÁSTRULA TEMPRANA DE *A. spurrelli* 30

5.2.5 EL ARQUENTERÓN SE ALARGA Y NO SE EXPANDE DURANTE LA GÁSTRULA MEDIA DE *A. spurrelli* 31

5.2.6 EL ARQUENTERÓN SE ALARGA Y EXPANDE EN LA GÁSTRULA TARDÍA DE *A. spurrelli* 32

5.2.7 EL NOTOCORDIO SE OBSERVÓ EN LA GÁSTRULA TARDÍA (ESTADIO 12.75) DE *A. spurrelli* 32

5.2.8 FORMACIÓN DE LA PLACA NEURAL EN LA POST-GÁSTRULA Y LOS PLIEGUES NEURALES DURANTE LA NÉURULA DE *A. spurrelli* 33

5.2.9 ESTADIOS AVANZADOS Y DESARROLLO DE BRANQUIAS DE *A. spurrelli* 34

5.2.10 EMBRIÓN A LA ECLOSIÓN (ESTADIO 24) 35

6. DISCUSIÓN 36

6.1 DESARROLLO TEMPRANO DE *A. spurrelli* ..... .36

6.1.1EL PATRÓN DE CLIVAJE EN *A. spurrelli* ES SIMILAR AL DE *G. riobambae* 36

6.1.2 LA PRESENCIA INICIAL Y EXPANSIÓN DEL BLASTOCELE EN *A. spurrelli* DIFIERE DE OTRAS ESPECIES DE ANFIBIOS 40

6.1.3 LA EXPANSIÓN DEL ARQUENTERÓN OCURRE EN LA GÁSTRULA TARDÍA EN *A. spurrelli*, A DIFERENCIA DE OTROS ANFIBIOS 43

6.1.4 EL DESARROLLO EN *A. spurrelli* ES RÁPIDO DE ACUERDO A SU MODO DE GASTRULACIÓN 45

6.1.5 LA RESPUESTA MUSCULAR Y DIFERENCIACIÓN DE LOS SOMITAS EN *A. spurrelli* 47

6.1.6 LA EXTENSIÓN DE LAS BRANQUIAS DURANTE LOS ESTADIOS AVANZADOS Y EMBRIÓN A LA ECLOSIÓN DE *A. spurrelli* 48

6.1.7 LA PIGMENTACIÓN EN LOS EMBRIONES DE *A. spurrelli* DIFIERE EN COMPARACIÓN A OTROS ANFIBIOS 49

6.2 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 51

7. LITERATURA CITADA 52

8. FIGURAS 59

9. TABLAS 74

10. ANEXOS 79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. El clivaje en *Agalychnis spurrelli* es irregular. Morfología del clivaje 61

Figura 2. El blastocele es reducido en la blástula de *A. spurrelli*. Morfología de los estadios de blástula de células grandes, medianas y pequeñas (estadio 7, 8 y 9)..... 63

Figura 3. Alargamiento del arquenterón y blastocele reducido en la gástrula de *A. spurrelli*. Morfología de la gástrula temprana media, tardía y post-gástrula (estadio 10, 11, 12, 12.5, 12.75 y 13)..... 65

Figura 4. Formación del notocordio al final de la gástrula y formación de los pliegues neurales en la néurula de *A. spurrelli*. Morfología de néurula temprana, media y tardía (estadio 14, 15 y 16) 67

Figura 5. Estadios avanzados y desarrollo de las branquias en *A. spurrelli*. Morfología del estadio de yema de la cola y del desarrollo de las branquias (estadio 17, 18, 19 y 21) 69

Figura 6. Extensión máxima de las branquias y embrión a la eclosión de *A. spurrelli*. Morfología del estadio de desarrollo completo de las branquias y embrión a la eclosión (estadio 22, 23 y 24): 71

Figura 7. Desarrollo de las branquias en *Agalyhcnis spurrelli*..... 73

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Promedio del diámetro de huevo de *Agalychnis spurrelli* 75

Tabla 2. Tiempo del desarrollo en horas y minutos de los embriones de *A. spurrelli* para cada postura. 76

Tabla 3. Tiempo de gastrulación de *A. spurrelli* 77

Tabla 4. Estadios del desarrollo de *A. spurrelli* en comparación a la tabla de desarrollo de *X. laevis* y la tabla general del desarrollo de anfibios Gosner (1960) 78

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Posturas obtenidas de *Agalychnis spurrelli* 80

Anexo 2. Comparación del diámetro del huevo, tiempo de gastrulación y tiempo de desarrollo de *A. spurrelli* con otras especies de anfibios..... 81

Anexo 3. Patrón de clivaje en *A. spurrelli*, *Gastrotheca riobambae*, *Xenopus laevis* e *Hyla arborea* 83

Anexo 4. Presencia de blastocele, arquenterón y pigmento en la blástula y gástrula de *A. spurrelli* en comparación con *X. laevis* 85

Anexo 5. Patrones de gastrulación en especies de desarrollo rápido y lento: 86

Anexo 6. Lista de fotografías y créditos..... 87

1. RESUMEN

El presente estudio describe y analiza el desarrollo embrionario, desde el clivaje hasta la eclosión del renacuajo de la rana *Agalychnis spurrelli* perteneciente a la familia Hylidae. El modo de ovoposición de esta rana consiste en depositar cientos de huevos en el haz de las hojas. El diámetro del huevo es de aproximadamente 2.9 mm. El tiempo desde la fertilización hasta la eclosión del renacuajo, bajo condiciones de laboratorio, es de 11 días aproximadamente. El desarrollo embrionario de esta especie fue dividido en 24 estadios previamente estandarizados por la tabla general del desarrollo de anfibios de Gosner (1960) y la tabla de desarrollo de *X. laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994). La morfología de los embriones fue evaluada en montajes enteros, biseciones y secciones de vibratomo con tinción fluorescente para núcleos celulares. La formación del blastocele en *A. spurrelli* difiere en comparación a otras especies de anfibios previamente estudiadas. Durante la gastrulación, la elongación e inflación del arquenterón no ocurren de manera simultánea. Sin embargo, de acuerdo a la velocidad y modo de gastrulación, se propone clasificar a esta especie dentro de las ranas de desarrollo rápido. En los embriones de *A. spurrelli*, el estadio de respuesta muscular difiere a lo reportado en otras ranas como *X. laevis* y ranas dendrobátidas. La extensión de las branquias en los estadios avanzados, es similar a lo descrito para su especie hermana *A. callidryas;* sin embargo, existen diferencias en comparación con otras especies de diferentes familias.

Este estudio es el primer reporte del desarrollo temprano de *A. spurrelli* y, por lo tanto, contribuye al conocimiento de las adaptaciones del desarrollo embrionario de ranas ecuatorianas con distintas estrategias reproductivas.

Palabras clave: Desarrollo embrionario, *Agalychnis spurrelli*, Patrón de clivaje, Blastocele, Gastrulación.

2. ABSTRACT

This study describes and analyzes the embryonic development, from cleavage to tadpole hatching in the frog *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae). The oviposition mode of these frogs consists in laying hundred of eggs on leaves overhanging streams. The egg diameter is about 2.9 mm. The time from fertilization to tadpole hatching is 11 days, under laboratory conditions. The early development of this specie was divided into 24 stages, by using the generalized table of frog early development of Gosner (1960) and the previously proposed table for *Xenopus laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994). Embryo morphology was evaluated in whole mounts, bisections, vibratome sections and fluorescent staining for cell nuclei. The morphology of cleavage resembles the previously described pattern of *G. riobambae*. The initial formation and growth of the blastocoel, differs from the data reported for other frogs. The processes of elongation and inflation of the archenteron did not ocurr simultaneously, like in the embryos of *X. laevis*. However, according to the speed and mode of gastrulation, *A. spurrelli* could be classified as a specie with rapid development. In the embryos of *A. spurrelli*, the initial stage of muscular response differs from other amphibians like *X. laevis* or dendrobatid frogs. The gill extension in the advanced embryos looks like the one reported for *Agalychnis callidryas*, but differs from the one in other amphibian families.

This study is the first report of the early development of *A. spurrelli*. Therefore, it contributes to the understanding of developmental adaptations in ecuadorian frogs with diferent reproductive strategies.

Key words: Embryonic development, *Agalychnis spurrelli*¸ Cleavage pattern, Blastocoel, Gastrulation.

3. INTRODUCCIÓN

Los anuros exhiben la mayor diversidad de modos reproductivos dentro de los vertebrados. Esta diversidad parece ser conducida por una continua evolución de los modos reproductivos directos y terrestres que surgieron a partir del modo basal acuático (Gómez-Mestre *et al*., 2012). Esta variedad de estrategias reproductivas, permite que existan variaciones adaptativas dentro del desarrollo embrionario de los anuros (Elinson y del Pino, 2012). El organismo de estudio propuesto en este trabajo es *Agalychnis spurrelli,* perteneciente a la familia Hylidae. Existen escasos estudios respecto al desarrollo temprano de este género de rana, de manera que la importancia del análisis de los embriones de *A. spurrelli*, consiste en ampliar la base comparativa de los estudios del desarrollo embrionario. *Agalychnis spurrelli* presenta variaciones en su desarrollo temprano, en comparación con otras especies descritas previamente, por lo que se estima que estas modificaciones sean consecuencia de su estrategia reproductiva.

Los anfibios han sido organismos estudiados dentro de un marco comparativo como modelo para los procesos evolutivos, así como para la comprensión de adaptaciones del desarrollo (Hanken, 1993; O´Rourke, 2007). El estudio del desarrollo temprano en anfibios se ha enfocado en analizar a profundidad distintas características de los embriones y el efecto que tiene la estrategia reproductiva en el desarrollo de cada especie.

El desarrollo temprano de los anfibios inicia con el proceso de clivaje, continuando con la gastrulación, la neurulación y finalmente la organogénesis. La rana modelo del desarrollo, *Xenopus laevis*, completa su ciclo de vida normalmente dentro del agua. Como resultado de la fertilización, el huevo comienza a dividirse, atravesando por 12 divisiones

síncronas y rápidas, produciendo miles de células pequeñas, sin presentar aumento en su tamaño (Elinson, 2011). Durante la primera división, que ocurre dentro de 90 minutos, la capa externa del embrión (córtex) rota 30° respecto a la masa interior de yema, proceso conocido como rotación cortical. Las once siguientes divisiones ocurren en intervalos de 20 a 30 minutos (Heasman, 2006). El eje animal-vegetal está asociado con las capas germinales prospectivas, donde las células del polo animal originarán el ectodermo, mientras que de las células del polo vegetal surgirá el endodermo y el mesodermo se originará en medio de estas capas. Dentro de esta masa de células, se desarrolla una cavidad llena de fluido en el polo animal, conocida como el blastocele. Esta cavidad es importante porque permitirá que se produzcan los movimientos celulares de la gastrulación. En este estadio el embrión se denomina blástula y tiene células animales pequeñas, de tamaño intermedio en la zona marginal y células vegetal grandes (Elinson, 2011).

La gastrulación es un conjunto de movimientos morfogenéticos que tiene como objetivos principales el cierre del blastoporo y la formación del arquenterón (Ewald *et al*., 2004). El inicio de la gastrulación está marcado por la formación de las células de botella, que se encuentran en la superficie del embrión, generando una hendidura denominada labio dorsal del blastoporo (Elinson, 2011). En *X. laevis*, la gastrulación implica principalmente la involución de la zona marginal, que gira hacia adentro sobre sí mismo y posteriormente se mueve a través del techo del blastocele. Este proceso por sí solo, no causa el cierre del blastoporo; es necesario que ocurra la elongación antero-posterior del cuerpo. Este evento sucede en gran parte por la convergencia y extensión dorsales. Estos movimientos permiten la elongación del eje del cuerpo y contribuyen a la involución y cierre del blastoporo (Keller *et al.*, 2003). Durante la gastrulación, la superficie vegetal externa se

mueve al interior, formando un tubo; mientras que la superficie animal se expande para reemplazarla. Este movimiento se denomina epíbole. Al final de la gastrulación, el embrión se encuentra completamente rodeado por la superficie animal. El tubo interno que se formó en la región vegetal se denomina arquenterón. Mientras la gastrulación se completa, las células ubicadas a lo largo de la unión del ectodermo y endodermo, se reúnen para cerrar el blastoporo (Elinson, 2011). Cuando este proceso termina, se da inicio a la neurulación. La primera señal del desarrollo neural se evidencia con la formación de los pliegues neurales, que se elevan formando el tubo neural. Esta estructura forma el cerebro en la cabeza y la espina dorsal en el cuerpo. El precursor embriónico del tubo neural es la placa neural, una región engrosada del ectodermo ubicada en la superficie dorsal del embrión (Greene y Copp, 2009; Elinson, 2011).

La organogénesis es un proceso decisivo dentro del desarrollo de los anfibios, porque el embrión se convierte en un organismo completamente funcional, capaz de sobrevivir independientemente. Mientras avanza este proceso, el embrión adquiere la forma de renacuajo (Revisado en Wolpert *et al.*, 2007). El proceso de eclosión en los embriones de *X. laevis* consiste de dos fases temporales, la primera, inducida por procesos físicos, ocurre cuando el embrión escapa de las dos capas de gelatina más externas. La segunda fase ocurre como resultado de procesos físicos y químicos, cuando el embrión eclosiona de la capa restante de gelatina (Carroll y Hedrick, 1974).

El desarrollo embrionario descrito para varias especies de anfibios parece seguir un patrón en común, sin embargo, estudios previos han demostrado que el desarrollo en estos organismos no es tan conservado como se asumía (Chipman, 2002). Dentro de los géneros comúnmente estudiados como *Gastrotheca*, *Eleutherodactylus*, *Bufo*, *Engystomops* y ranas

de la familia Dendrobatidae, se han encontrado importantes diferencias en cuanto a su desarrollo (Elinson y del Pino, 2012). Además, existe una gran diversidad de estrategias reproductivas dentro de los anuros, así como otras variables que influyen en el patrón de desarrollo de cada especie (Haddad y Prado, 2005). Por esta razón, la importancia de extender el estudio en varias especies de anfibios, radica en conocer las distintas variaciones que presenta cada especie en su desarrollo.

El desarrollo embrionario ha sido estudiado en especies de ranas que presentan diferencias en cuanto a su estrategia reproductiva, número de huevos por postura, diámetro del huevo y velocidad del desarrollo (del Pino *et al*., 2007). De acuerdo al tiempo que tardan en finalizar la gastrulación desde la fertilización. Estas especies han sido separadas en especies de desarrollo rápido, como *Xenopus laevis*, ranas del género *Engystomops* y ranas de la familia Centrolenidae y de desarrollo lento como ranas dendrobátidas y *Gastrotheca riobambae* (del Pino *et al*., 2007; Moya *et al*., 2007). La rana *X. laevis* presenta un modo reproductivo acuático con cientos de huevos por postura, con un diámetro de 1.2 mm (Nieuwkoop y Faber, 1994). El tiempo desde la fertilización hasta el final de la gastrulación es de 14 horas (Nieuwkoop y Faber, 1994). Las especies del género *Engystomops* (Leptodactylidae) se caracterizan por formar nidos de espuma donde los embriones se desarrollan hasta la eclosión. El diámetro de los huevos difiere entre cada especie, presentando valores aproximados entre 1.1 y 1.3 mm. Estas ranas depositan alrededor de 130 huevos por postura. El tiempo de gastrulación es de 24 horas (Ryan *et al*., 1983; del Pino *et al*., 2007; Romero-Carvajal *et al.,* 2009). *Hyalinobatrachium fleischmanni* (Centrolenidae), deposita sus huevos debajo de las hojas de los árboles. El macho brinda cuidado parental a la postura a fin de mantener la humedad en la misma (Delia *et al*., 2010). El diámetro aproximado del huevo es de 2.1 mm. Esta especie tiene

desarrollo rápido y su gastrulación tarda 24 horas en concluir (Salazar- Nicholls y del Pino, 2015). Las ranas dendrobátidas forman nidos terrestres y presentan cuidado parental por parte del macho. Los machos de *Epipedobates machalilla* (Dendrobatidae) cargan los renacuajos hasta el agua en donde los renacuajos se desarrollan hasta la metamorfosis. Los adultos depositan alrededor de 15 huevos por postura, el diámetro del huevo es de 1.6 mm aproximadamente. El tiempo que tarda en finalizar la gastrulación es de 4 a 6 días (Duellman y Trueb, 1986; Benítez y del Pino, 2002; del Pino *et al.*, 2004; del Pino *et al*., 2007). Los embriones de la rana marsupial *Gastrotheca riobambae* (Hemiphractidae), se desarrollan lentamente dentro de una bolsa que posee la hembra en su espalda hasta que eclosionan como renacuajos avanzados. Los huevos tienen un diámetro aproximado de 3 mm. El tiempo que tardan los embriones desde la fertilización hasta el final de la gastrulación es de 14 días (del Pino, 1989; del Pino *et al*., 2007).

En especies de ranas con distintos modos de reproducción, se ha observado diferencias temporales en la ocurrencia de los movimientos morfogenéticos de la gastrulación, lo que ha contribuido a una mejor comprensión de la modularidad de estos anfibios (Elinson y del Pino, 2012).

En las especies de desarrollo rápido como *X. laevis*, ranas del género *Engystomops* y ranas de la familia Centrolenidae, se observa un solapamiento temporal de eventos durante la gastrulación (del Pino *et al*., 2007). Los movimientos de convergencia y extensión dorsales se inician durante este proceso. La elongación del arquenterón y del notocordio ocurre simultáneamente con la involución durante la gástrula media (del Pino *et al*., 2007). En contraste, en las ranas de desarrollo lento como *E. machalilla* y *G. riobambae*, la convergencia y extensión dorsales ocurren después de la gastrulación (del

Pino *et al.*, 2004). En la rana marsupial *G. riobambae*, el proceso de elongación del arquenterón y del notocordio ocurre después del cerramiento del blastoporo. Debido a la acumulación de células que involucionan por el labio dorsal del blastoporo, se forma un disco embriónico del cual se desarrolla el cuerpo del embrión. Estas características resultan en la formación de un collar circumblastoporal (del Pino, 1996; Moya *et al*., 2007). En *E. machalilla*, la elongación del notocordio ocurre después de la gastrulación. Las células que involucionan por el labio dorsal del blastoporo durante este proceso se acumulan y forman un collar circumblastoporal en las ranas dendrobátidas, que se asemeja morfológicamente al observado en *G. riobambae.* Sin embargo, las especies de dendrobátidos no desarrollan un disco embriónico (Benítez y del Pino, 2002; del Pino *et al*., 2004; Moya *et al*; 2007).

Estudios previos sobre el desarrollo temprano en ranas de la familia Hylidae, se han enfocado en describir y analizar características de los estadios avanzados, como la yema de la cola y la larva de *A. spurrelli* (Sánchez, 2010; Salica *et al*., 2011).

La rana *A. spurrelli* deposita abundantes huevos sobre las hojas de los árboles. El número de huevos por postura varía entre 14 y 67, en poblaciones de Costa Rica (Savage, 2002). En cambio, se ha reportado 12 a 322 huevos en poblaciones de Colombia (Vargas-Salinas *et al.*, 2000). Se han realizado observaciones detalladas del comportamiento reproductivo de esta especie en poblaciones tanto de Centroamérica (Scott y Starrett, 1974) como de Sudamérica (Vargas-Salinas *et al.*, 2000). Los adultos son observados comúnmente sobre ramas y hojas de árboles, alrededor de cuerpos de agua estancados, ya sean naturales o artificiales (Ortega-Andrade y Tobar-Suárez, 2011; Vargas-Salinas y Torres, 2013). Los adultos ubicados en estratos altos del bosque descienden hacia cuerpos de agua ubicados a nivel del suelo, con la finalidad de reproducirse. Las hembras ponen las

masas de huevos en hojas ubicadas desde 1 a 3 metros sobre el agua, pero las posturas pueden ubicarse hasta los 8 metros sobre el suelo (Scott y Starrett, 1974). Antes de la ovoposición, los adultos de *Agalychnis spurrelli,* y otras especies del género *Agalychnis,* en amplexus, bajan de la vegetación y se introducen unos minutos en el agua para que las hembras llenen su vejiga con agua para inyectarla en la gelatina de sus huevos (Pyburn, 1970). Esta es una de las estrategias usadas por especies con ovoposición fuera del agua para disminuir los riesgos de mortalidad por desecación en la nidada de huevos (Wells, 2007). Los renacuajos eclosionan 8 días después de la ovoposición (Vargas-Salinas y Torres, 2013).

El presente estudio describe la morfología externa e interna de los embriones de *Agalychnis spurrelli* desde el clivaje hasta la eclosión del renacuajo. Además, se analizan las distintas adaptaciones del desarrollo de *A. spurrelli* en comparación con otras especies de anfibios descritas previamente, como *Xenopus laevis*, *Gastrotheca riobambae* e *Hyla arborea.*

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS EMBRIONES

Los embriones de *Agalychnis spurrelli* se obtuvieron de posturas donadas por la Iniciativa de Conservación "Balsa de los Sapos" de la PUCE al Laboratorio de Biología del Desarrollo. Los especímenes provienen de la localidad de San Lorenzo en la provincia de Esmeraldas. En el Laboratorio de Biología del Desarrollo, los embriones fueron incubados a temperatura ambiente en una cámara húmeda elaborada con una caja Petri, papel toalla con agua destilada y plástico. La caja Petri es rotulada con los datos correspondientes a la postura como son el nombre de la especie, el número de huevos depositados, el estadio en que se encuentran los huevos, la fecha y hora a la que se encontró la postura.

4.2 FIJACIÓN Y MANEJO DE LOS EMBRIONES

4.2.1 MANEJO DE LOS EMBRIONES

La observación de embriones se realizó a temperatura ambiente (aprox. 18°C) en el laboratorio y fueron manipulados en solución de Steinberg 0,15% (Ver sección 4.2.1.1). Se utilizó el estereomicroscopio WILD Heerbrugg y lámparas de fibra óptica KL 1500 (Zeiss).

4.2.2 SOLUCIONES Y FIJATIVOS

4.2.2.1 SOLUCIÓN DE STEINBERG (Rugh, 1962)

- 58 mM NaCl
- 0,65 mM KCl
- 0,85 mM MgSO4
- 5 mM Tris, pH 8
- 0,34 mM Ca $(NO_3)_2$
- Agua destilada

4.2.2.2 SOLUCIÓN SALINA TAMPÓN FOSFATO (PBS)

- 1,5 mM KH_2PO_4
- 7 mM Na_2HPO_4
- 137,7 mM NaCl

4.2.2.3 10% FORMALDEHÍDO (FORMALINA)

4.2.2.4 FIJATIVO SMITH

4.2.2.4.1 SOLUCIÓN A

- 35 mM dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

4.2.2.4.2 SOLUCIÓN B

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

4.2.2.5 FIJATIVO DE MEMFA

- 0,1 M MOPS pH 7.4
- 2mM EDTA
- 1mM $MgSO_4$

4.2.2.6 GELATINA 7,5 %

- 1,5 gr gelatina “Royal” sin sabor
- 20 ml PBS 1x (4.2.1.2)

4.2.2.7 AGAROSA 6%

- 1,2 gr agarosa 100%
- 20 ml PBS 1x (4.2.1.2)

4.2.3 FIJACIÓN DE LOS EMBRIONES

Previo a la fijación de los embriones, se procedió a retirar las capas de gelatina que cubrían a los huevos, con la ayuda de pinzas finas. Los embriones fueron manipulados en la solución salina Steinberg 0,15x (4.2.1.1), la misma que mantiene el pH estable y evita la deshidratación.

4.2.3.1 FIJACIÓN CON SMITH

El fijativo Smith tiene la función de preservar la morfología externa de los embriones. Este fijativo es preparado inmediatamente antes de usar, en una proporción 1:1 de las soluciones A (Ver sección 4.2.1.4.1) y B (Ver sección 4.2.1.4.2).

Los embriones sin gelatina fueron fijados durante 24 horas en frascos oscuros a temperatura ambiente. Al día siguiente se realizaron alrededor de 8 lavados con agua destilada para eliminar el exceso de fijativo. Posteriormente, se procedió a retirar la membrana vitelina que cubre al embrión. Por último, los embriones se almacenaron en una solución 2:3 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

El fijativo de Memfa se prepara con una solución de Memfa 1X (Ver sección 4.2.1.5) y formaldehído 3,7%, en agua destilada. Los embriones sin membrana vitelina, fueron incubados en el fijativo de Memfa (Ver sección 4.2.1.5) durante 2.5 horas a temperatura ambiente. Los embriones fueron trasladados gradualmente a metanol para ser almacenados a -20°C.

4.3 OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA INTERNA Y EXTERNA DE LOS EMBRIONES

4.3.1 BISECCIONES Y SECCIONES EN VIBRATOME

Los embriones enteros en distintos estadios, fijados previamente en el fijativo de Smith, fueron embebidos en gelatina 7,5% (Ver sección 4.2.1.6) e incubados por 4 horas a 40°C. Posteriormente, fueron trasladados a una caja con agarosa líquida al 6% (Ver sección 4.2.1.7). Una vez que la agarosa se tornó sólida, se realizó una bisección con bisturí. Las bisecciones fueron almacenadas en PBS 1X (Ver sección 4.2.1.2) a 4°C, hasta realizar los respectivos ensayos. Para las secciones en vibratomo, se cortó un cubo de agarosa sólida que contenía al embrión y fue adherido a un porta-tejidos. El porta-tejidos fue colocado en la plataforma del vibratomo para el seccionamiento. Se realizaron secciones sagitales, transversales y horizontales de 45 µm de grosor. Las secciones fueron realizadas a una velocidad de 2,5 rpm y amplitud de 6, a un ángulo de 25° y fueron almacenadas en cajas con PBS 1X (4.2.1.2) a 4°C.

4.3.2 TINCIÓN FLUORESCENTE PARA NÚCLEOS

Las secciones realizadas en el vibratomo fueron teñidas con el tinte fluorescente para núcleos Hoescht 33258. Este tinte se adhiere al ADN, permitiendo su observación a través de la iluminación fluorescente. Las secciones fueron incubadas en oscuridad y a temperatura ambiente por 20 minutos en una solución de 1 µl de Hoescht en 1ml de PBS (4.2.1.2). Las secciones fueron lavadas alrededor de 8 veces con PBS 1X (4.2.1.2). Por último, se realizó el montaje en placas de las secciones teñidas, colocando una gota de glicerina en un portaobjetos y cubriéndolas con un cubreobjetos. Las secciones fueron almacenadas a -20°C, hasta su posterior registro fotográfico.

4.4 MEDICIONES Y MICROFOTOGRAFÍA DE EMBRIONES

Para las microfotografías de montaje entero, placas y mediciones se utilizó un estereomicroscopio Stemi SV6 y un estereomicroscopio OLYMPUS CKX4. Para las microfotografías con el estereomicroscopio Stemi SV6, se utilizó la cámara AxioCam y el programa de procesamiento de imágenes AxioVision 4.6.3 (Zeiss). Para las microfotografías con el estereomicroscopio OLYMPUS CKX4, se utilizó la cámara Olympus y el programa de procesamiento de imágenes Cellsense. Las placas de tinción fluorescente para núcleos fueron fotografiadas con el microscopio AxioObserver Z1 (Zeiss), acoplado a una cámara AxioCam y el programa AxioVision 4.6.3. Las imágenes fueron editadas con el programa Adobe Photoshop CS6.

5. RESULTADOS

5.1 DESARROLLO DE LOS EMBRIONES DE *Agalychnis spurrelli*

Los huevos de *A. spurrelli* presentan una coloración turquesa, con una pigmentación marrón en el polo animal y su diámetro promedio documentado es de 2,9 mm ± 0,102 (Tabla 1).

El desarrollo embrionario de *A. spurrelli* comienza con la fertilización del huevo, seguido por la etapa de clivaje, el proceso de gastrulación, la neurulación y la organogénesis, hasta concluir con la eclosión del renacuajo. El desarrollo temprano fue dividido en 24 estadios, desde la fertilización hasta la eclosión del renacuajo. Los estadios de clivaje fueron determinados a partir de la tabla de desarrollo de *X. laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994). Los siguientes estadios fueron descritos mediante la tabla general del desarrollo de anfibios Gosner (1960) (Tabla 4).

El tiempo promedio que tardan los embriones de *A. spurrelli* en desarrollarse desde la fertilización hasta su eclosión, es de 11 días a temperatura ambiente. El tiempo de desarrollo fue calculado a partir de cuatro posturas obtenidas durante el estudio (Anexo 1) y los tiempos de cada una se detallan en la Tabla 2. El tiempo de gastrulación de *A. spurrelli* fue de 20 horas (Tabla 3) y se determinó desde la formación del labio dorsal del blastoporo (estadio 10) hasta el cierre del blastoporo (estadio 13).

5.2 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LOS EMBRIONES DE *A. spurrelli*

5.2.1 EL CLIVAJE DE *A. spurrelli* ES IRREGULAR E INCOMPLETO

La figura 1 muestra el proceso de clivaje de *A. spurrelli*, desde que el huevo es fertilizado hasta el estadio de 32 células. El tiempo registrado para este proceso, se detalla en horas y minutos (Fig.1 A-L). En la figura 1A, se observa el huevo fertilizado. La primera división celular (estadio de 2 células), ocurrió 75 minutos después de la fertilización. El segundo surco del clivaje, ocurre de manera perpendicular al primero (Fig. 1G) y tarda 23 minutos después del primer clivaje. En el tercer clivaje (estadio de 8 células), se observó la formación de 2 surcos perpendiculares al segundo surco del clivaje (Fig. 1H-I). El tiempo transcurrido entre el segundo y el tercer clivaje fue de 20 minutos. El embrión alcanzó el estadio de 10 blastómeros, 3 horas 25 minutos después de iniciado el primer clivaje. Se observó que las divisiones del tercer clivaje no fueron ecuatoriales. La figura 1K, muestra el estadio de 16 células.

Se observó un clivaje incompleto en el polo vegetal durante las divisiones. No se observó la formación de blastómeros vegetales hasta el estadio de 32 células. El tiempo total que el embrión tardó desde la fertilización hasta alcanzar el estadio de 32 células (estadio 6) fue de 6 horas 45 minutos. En el embrión en estadio de 32 células, se observó que los blastómeros en el hemisferio animal presentan un tamaño mayor al estadio anterior (Fig. 1L).

Los tiempos que se describen en la figura 1 fueron tomados de un embrión para la documentación del clivaje, estos tiempos variaron con respecto al registrado para la postura que se encontraba incubada en la cámara húmeda.

5.2.2 EL BLASTOCELE ESTÁ AUSENTE EN LA BLÁSTULA TEMPRANA Y MEDIA DE *A. spurrelli*

5.2.2.1 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA BLÁSTULA DE CÉLULAS GRANDES Y CÉLULAS MEDIANAS (ESTADIO 7 Y 8)

En el estadio de blástula de células grandes (estadio 7), no se observó la presencia de blastocele. La morfología interna en este estadio no se muestra debido al daño causado durante el montaje en la placa. El embrión presentó divisiones celulares en el hemisferio vegetal (Fig. 2A). Las células animales son de menor tamaño que las células vegetales. El estadio de blástula de células medianas es equivalente al estadio 8 en la tabla de Gosner (1960). No se observó la presencia de blastocele, sin embargo, se distinguieron espacios intercelulares en el embrión (Fig. 2C). Las células presentan una pigmentación marrón obscura alrededor de los núcleos. (Fig. 2B).

5.2.3 EL BLASTOCELE SE FORMA EN LA BLÁSTULA TARDÍA DE *A. spurrelli*

5.2.3.1 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA BLÁSTULA DE CÉLULAS PEQUEÑAS (ESTADIO 9)

El estadio de blástula de células pequeñas o blástula tardía es equivalente al estadio 9 de la tabla de Gosner (1960). El blastocele se evidencia por primera vez en este estadio y presenta un tamaño pequeño (Fig. 2E). Se observa pigmento alrededor de los núcleos celulares.

5.2.4 EL BLASTOCELE ES DE TAMAÑO REDUCIDO EN LA GÁSTRULA TEMPRANA DE *A. spurrelli*

5.2.4.1 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA (ESTADIO 10 Y 11)

El primer indicio del inicio la gastrulación es la formación de una hendidura en la región sub-ecuatorial del embrión, conocida como labio dorsal del blastoporo. En la figura 3A, se observa la hendidura producida por la invaginación de las células. En la sección sagital, se observa el blastocele de tamaño pequeño ubicado en el hemisferio animal. Además se observa que el techo del blastocele está formado por una capa de células muy delgada (Fig. 2B). En otras secciones de este estadio, se observó un blastocele de tamaño reducido.

La formación del tapón de yema en el estadio 11, indica un avance en el proceso de gastrulación. Esta estructura es el resultado de la extensión del labio dorsal del blastoporo hacia la región ventral del embrión (Fig. 3C). En la figura 3D, se observaron los labios dorsal y ventral. Como resultado de la invaginación de las células del labio dorsal, se observa el inicio de la formación del arquenterón.

5.2.5 EL ARQUENTERÓN SE ALARGA Y NO SE EXPANDE DURANTE LA GÁSTRULA MEDIA DE *A. spurrelli*

5.2.5.1 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA GÁSTRULA MEDIA (ESTADIO 12)

En la sección sagital de este estadio, se observó el arquenterón alargado a través de la región dorsal del embrión; sin embargo, el arquenterón no estaba expandido (Fig. 3F). En otras secciones de *A. spurrelli* en el estadio 12, se observó la presencia de un pequeño blastocele en el hemisferio animal del embrión. Además, se observó un surco que separa las células del ectodermo y del endomesodermo, denominado cleft de Brachet.

5.2.6 EL ARQUENTERÓN SE ALARGA Y EXPANDE EN LA GÁSTRULA TARDÍA DE *A. spurrelli*

5.2.6.1 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA GÁSTRULA TARDÍA (ESTADIO 12.5 Y 12.75)

En la bisección sagital del estadio 12.5, se observó la expansión y alargamiento del arquenterón. El tamaño de esta estructura aumentó con relación al estadio de gástrula media. No se observó la presencia de blastocele en este estadio (Fig. 3H).

La bisección sagital del estadio 12.75, muestra la extensión completa del arquenterón y no se distinguió la presencia de blastocele (Fig. 3J).

5.2.7 EL NOTOCORDIO SE OBSERVÓ EN LA GÁSTRULA TARDÍA (ESTADIO 12.75) DE *A. spurrelli*

En la sección transversal de la gástrula tardía se identificó el notocordio en los embriones de *A. spurrelli* (Fig. 4B). En la morfología externa del embrión en este estadio, se observó la formación del surco neural a lo largo de la línea dorsal del embrión. Este surco se vuelve visible desde el tapón de yema, extendiéndose de posterior a anterior (Fig. 3I).

5.2.8 FORMACIÓN DE LA PLACA NEURAL EN LA POST-GÁSTRULA Y LOS PLIEGUES NEURALES DURANTE LA NÉURULA DE *A. spurrelli*

5.2.8.1 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA POST-GÁSTRULA (ESTADIO 13) Y NÉURULA (ESTADIO 14, 15 Y 16)

La morfología externa del embrión en estadio 13 (Fig. 3K), muestra el inicio de la formación de la placa neural. Además, se observó una estructura presente en la zona caudal del embrión denominada blastoporo. La figura 3L corresponde a una bisección sagital del estadio de post-gástrula. Se evidencia una reducción en el tamaño del arquenterón y una estructura ubicada en el techo del arquenterón, que corresponde al engrosamiento de la placa neural. En una sección transversal anterior realizada para este estadio, el notocordio se encuentra ubicado en el centro, diferenciándose del mesodermo paraxial que se encuentra a los lados de esta estructura. Las capas germinales ectodermo, endodermo y mesodermo paraxial se diferenciaron en este estadio (Fig. 4A-4B).

En la morfología externa de la néurula temprana (estadio 14), los pliegues neurales comenzaron a elevarse en la región más rostral del embrión y el blastoporo está presente en la región caudal (Fig. 4C). En la tinción fluorescente de núcleos (Fig. 4D) se observó la placa neural, el notocordio, el endodermo que cubre al techo del arquenterón y el mesodermo paraxial. Además, se distinguió el límite entre el mesodermo paraxial y el notocordio.

En una sección de fluorescencia de la néurula media (estadio 15), se identificaron los pliegues neurales engrosados con una formación compacta en sus células. Además, se

observó el notocordio, el mesodermo paraxial, el endodermo y los límites de las capas germinales (Fig. 4E-4F).

La figura 4H, muestra la tinción fluorescente de una sección transversal en el estadio de néurula tardía (estadio 16). En este estadio se formó el tubo neural, a causa del cerramiento de los pliegues neurales y se observa el notocordio con una forma redondeada (Fig. 4G-4H).

5.2.9 ESTADIOS AVANZADOS Y DESARROLLO DE BRANQUIAS DE *A. spurrelli*

5.2.9.1 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DEL ESTADIO DE YEMA DE LA COLA, ESTADIO DE RESPUESTA MUSCULAR Y DESARROLLO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 17, 18, 19, 20, 21, 22 Y 23)

En el embrión entero de estadio de yema de la cola (estadio 17, Fig. 5A), el cuerpo se encuentra alargado. Se observaron los arcos branquiales en la parte lateral de la cabeza y la yema de la cola. En el estadio 18, se formaron el arco mandibular y los pronefros en la región lateral de la cabeza. También es posible distinguir los somitas a lo largo del cuerpo del embrión. Los embriones fueron estimulados mecánicamente, pero no se registró respuesta muscular en este estadio. La respuesta muscular en los embriones de *A. spurrelli*, se registró a partir del estadio 20.

Usando tinción de fluorescencia en las secciones horizontales de los estadios avanzados, se identificaron los somitas (Fig. 5B-5D-5F-5H). A partir del estadio 21, se

observan fibras multinucleadas en el cuerpo del embrión, lo que indica la diferenciación de los mioblastos (Fig. 5H).

En los embriones de *A. spurrelli*, las branquias comienzan a desarrollarse a partir del estadio 19 (Fig. 5E), formándose 5 ramificaciones cortas en la rama anterior y 2 ramificaciones cortas en la rama posterior. En el estadio 20, la rama anterior posee 7 ramificaciones y la rama posterior 3 ramificaciones. En el estadio 21 (Fig. 5G), la rama anterior de las branquias presenta 9 ramificaciones que se han alargado y 5 ramificaciones posteriores, igualmente más extensas, con relación a los estadios anteriores. En el estadio 22 (Fig. 6A), la rama anterior y posterior presenta 10 y 6 ramificaciones extensas, respectivamente. El embrión alcanza su máxima extensión de las branquias en el estadio 23 (Fig. 6C), presentando 12 ramificaciones en la rama anterior y 6 ramificaciones en la rama posterior (Fig. 7).

5.2.10 EMBRIÓN A LA ECLOSIÓN (ESTADIO 24)

La figura 6D, presenta el embrión entero en el estadio a la eclosión. En el acercamiento a la cabeza, se observa el opérculo y el estomodeo (Fig. 6E). Los embriones de *A. spurrelli* eclosionan con ramificaciones branquiales, que han reducido su tamaño. Se observó que algunos embriones de *A. spurrelli*, eclosionan con ramificaciones branquiales únicamente a un lado del embrión. La rama anterior de la branquia posee 5 ramificaciones pequeñas y la rama posterior 3 ramificaciones.

6. DISCUSIÓN

La descripción del desarrollo de *A. spurrelli* muestra los cambios morfológicos externos e internos que atraviesan los embriones durante su desarrollo, permitiendo la comparación con las tablas previamente descritas para *X. laevis* (Nieuwkoop & Faber, 1994) y la tabla general del desarrollo del anfibios Gosner (1960). En un estudio realizado por Vargas y Gutiérrez (2005), se describe de forma general una tabla incompleta del desarrollo temprano de *A. spurrelli*, debido a que el análisis se enfoca en documentar los cambios morfológicos que suceden en los embriones y renacuajos de esta rana para registrar los niveles y causas de mortalidad en ellos. El presente análisis comparativo del desarrollo de *A. spurrelli* con otras especies de anfibios, permitió evidenciar las variaciones que presenta esta especie a lo largo de su desarrollo, por lo que se sugiere que estas modificaciones son consecuencia de su estrategia reproductiva.

6.1 DESARROLLO TEMPRANO DE *Agalychnis spurrelli*

6.1.1 EL PATRÓN DE CLIVAJE EN *A. spurrelli* ES SIMILAR AL DE *G. riobambae*

El primer clivaje de *A. spurrelli*, consiste en una división celular que divide ambos polos del huevo, atravesando su eje medio, mientras que el segundo clivaje es una división horizontal. Los embriones requieren 2 horas y 15 minutos desde la fertilización hasta alcanzar el primer clivaje. En la tercera división del clivaje de *A. spurrelli*, se forman dos surcos paralelos al surco del primer clivaje y los embriones tardan alrededor de 2 horas y 30 minutos en alcanzar el tercer clivaje desde la fertilización. Desde este estadio, ocurren

nuevas divisiones en los blastómeros aun cuando los surcos del tercer clivaje no se han formado completamente. Este tipo de clivaje genera blastómeros animales completamente formados, mientras que otros desarrollan progresivamente los surcos.

En la rana marsupial el primer y segundo clivaje intersectan en el polo animal, como se muestra en el Anexo 3. La segunda división del huevo de esta rana produce 4 blastómeros de tamaño desigual (del Pino y Loor-Vela, 1990). Los embriones de *G. riobambae* tardan de 16 a 20 horas desde el amplexus hasta completar el primer clivaje. A partir del tercer clivaje, los planos de división en *G. riobambae* se asemejan a los de *A. spurrelli*, formándose dos surcos paralelos al surco del primero clivaje. En este estadio, los blastómeros de la rana marsupial se dividen a distintas velocidades y el patrón del clivaje puede diferir entre embriones de la misma postura. La formación de los surcos del tercer clivaje, ocurre 24 horas después del amplexus. Es posible que ocurran nuevas divisiones en los blastómeros aun cuando los surcos del tercer clivaje estén incompletos. Un patrón similar está presente en los embriones de *A. spurrelli* (Fig. 1I-1J).

Las divisiones del clivaje en *A. spurrelli* y *G. riobambae* difieren del patrón descrito para *X. laevis.* Generalmente, las divisiones en *X. laevis* muestran un patrón regular en el que el huevo atraviesa por 12 divisiones síncronas, en intervalos de 30 minutos. Posterior a estas divisiones, las divisiones se vuelven asíncronas (Heasman, 2006). En contraste con *X. laevis,* el plano del tercer clivaje en *A. spurrelli* y *G. riobambae* no es ecuatorial y el huevo no se divide en 4 blastómeros animales pequeños y 4 blastómeros vegetales grandes (Elinson, 2011). En *X. laevis* el embrión de 16 células, corresponde al estadio 5 (Nieuwkoop y Faber, 1994). Algunos embriones de *G. riobambae* en este estadio, no completan la formación de 16 células y presentan mayor o menor número de blastómeros. De igual manera, el número de blastómeros en estadios más

avanzados del clivaje, no coinciden con lo esperado para un clivaje síncrono (del Pino y Loor-Vela, 1990). Este patrón se observa también en los embriones en clivaje de *A. spurrelli*.

La descripción del clivaje de la rana *Hyla arborea*, perteneciente a la familia Hylidae (Anexo 3), presenta un patrón regular como el descrito en la tabla de Gosner (1960) y como el patrón descrito para *X. laevis*. La primera división del clivaje en *H. arborea* ocurre 2 horas después de la fertilización del huevo. El segundo clivaje tarda 20 minutos más en completarse. La tercera división del clivaje ocurre 3 horas después de la fertilización (Sayim y Kaya, 2008).

Otra variación en el patrón de clivaje, se ha reportado para la rana de desarrollo directo *E. coqui.* En esta especie, la primera división latitudinal que divide al embrión en blastómeros animales y vegetales ocurre en el estadio de 16 células, mientras que en *X. laevis* esta división se da en el estadio de 8 células (Fang *et al*., 2000; Ninomiya *et al*., 2001). En *E. coqui* la división latitudinal ocurre muy cerca del polo animal, de manera que las 8 células animales representan el 1% del volumen del embrión (Ninomiya *et al*., 2001). En *A. spurrelli*, no existe una división latitudinal que divide al embrión en blastómeros animales y vegetales como lo reportado para *E. coqui* y *X. laevis.*

Las características del clivaje observadas en *A. spurrelli*, son semejantes al patrón descrito para *G. riobambae*, siendo así diferente al clivaje reportado para la mayoría de anfibios. No existe sincronía en la formación de los surcos del clivaje en los embriones de *A. spurrelli* (Fig. 1K-1L) y *G. riobambae*, sino que los surcos se forman de manera irregular en la región animal, a partir del tercer clivaje. Este patrón de clivaje genera una mayor cantidad de blastómeros pequeños y numerosos en la región animal que en la región vegetal. En *G. riobambae*, la región vegetal se fragmenta lentamente en blastómeros

pequeños mientras avanza el clivaje (del Pino y Loor-Vela, 1990). Sin embargo, en *A. spurrelli* no se observaron divisiones celulares en la región vegetal durante el clivaje temprano.

El patrón de clivaje observado en *A. spurrelli,* sugiere una tendencia hacia el huevo meroblástico, debido a la gran cantidad de vitelo en el polo vegetativo que no se divide durante los estadios de clivaje. La cantidad de yema que poseen los huevos, es un factor importante que permite que existan variaciones durante el desarrollo temprano de los embriones. Por ejemplo, la evolución del huevo amniote, involucra un aumento en la cantidad de yema y el clivaje meroblástico característico de este huevo, está asociado con el incremento en la proporción de yema en el huevo (Elinson y Beckham, 2002). En algunos anfibios y amniotes, como las aves, la región vegetal del huevo no contribuye en la formación definitiva del embrión, principalmente tiene una función nutritiva (Arendt y Nübler-Jung, 1999). A pesar de poseer estas características embrionarias, los huevos de los anfibios no forman un disco embriónico, a excepción de *G. riobambae.*

El incremento en el tamaño del huevo, hasta exceder los 2 mm de diámetro, es un factor que provoca que no ocurran clivajes latitudinales durante las primeras divisiones celulares y los clivajes meridionales están restringidos únicamente al primer y segundo surco del clivaje. Este patrón puede deberse a que mientras aumenta el tamaño del huevo, los husos mitóticos de los blastómeros, no pueden orientarse en ángulos rectos a los formados inicialmente, produciendo planos de clivaje irregulares (del Pino y Loor-Vela, 1990).

Se sugiere realizar posteriores investigaciones con el huevo y embriones tempranos de *A. spurrelli* para poder determinar la influencia de la cantidad de yema y tamaño del huevo en el desarrollo temprano de esta especie.

6.1.2 LA PRESENCIA INICIAL Y EXPANSIÓN DEL BLASTOCELE EN *A. spurrelli* DIFIERE DE OTRAS ESPECIES DE ANFIBIOS

El blastocele cumple dos funciones importantes en los anfibios: permite la migración celular durante la gastrulación y evita el contacto de las células vegetales del piso del blastocele (Revisado en Gilbert, 2003). Estudios previos en los embriones de *X. laevis*, han revelado que las especializaciones morfológicas asociadas con los mecanismo de clivaje y formación del blastocele, ocurren en el inicio de la primera división del huevo. Estas especializaciones consisten en la formación de uniones a lo largo del clivaje y en la secreción de fluidos en espacios extracelulares, incluido el blastocele. El cierre de las uniones de los surcos del clivaje, están involucradas con la formación y el desarrollo del blastocele. Cuando esta cavidad alcanza su máxima extensión, las uniones de los surcos del clivaje se forman cada vez más cerca del blastocele, de manera que la expansión progresiva de los surcos hace que la cavidad sea más pequeña. De esta forma, la presencia o ausencia de las uniones ayuda a determinar el tamaño, la forma y la localización del blastocele durante el desarrollo temprano. Estas especializaciones hacen de la división celular y la formación del blastocele sean procesos estrechamente relacionados (Kalt, 1971). El fluido del blastocele, es producto de las células que abarcan esta cavidad, ya sea por metabolismo celular que involucra respiración o excreción, o por actividad celular. Las células de la región vegetal están involucradas en la formación del fluido del blastocele, permitiendo el flujo de materiales sobre la masa de yema, con el fin de que ocupen sus posiciones definitivas en el piso del blastocele (Nicholas, 1945). En estudios realizados con algunas especies de anfibios, se ha determinado que el fluido del blastocele tiene únicamente una función mecánica y no morfogenética durante la gastrulación (Stableford, 1949).

En la morfología interna de la blástula temprana y media de *A. spurrelli*, no se observó la presencia de blastocele (Fig. 2C). En *X. laevis* y *G. riobambae*, esta estructura comienza a formarse más temprano (Kalt, 1971; del Pino y Loor-Vela, 1990; Bauer *et al.*, 1994). En *X. laevis*, la formación del blastocele inicia en la blástula temprana (estadio 7) y los blastómeros animales ocupan sus posiciones originales con respecto a esta cavidad (Bauer *et al.*, 1994; Elinson, 2011). En los embriones de *G. riobambae*, en el estadio de blástula media, el blastocele se vuelve visible en el polo animal (Elinson y del Pino, 1985). En ranas centrolénidas, se observa el blastocele desde la blástula temprana (Salazar-Nicholls y del Pino, 2015).

En el estadio de blástula tardía en *A. spurrelli* se observó la formación inicial de un pequeño blastocele en la región animal (Fig. 2E), mientras que en la blástula media se distinguieron únicamente algunos espacios intercelulares dispersos a lo largo de la región marginal del embrión (Fig. 2C). Estos resultados, indican que la formación del blastocele es tardía en los embriones de *A. spurrelli*, al igual que su tamaño es reducido en comparación con otras especies de anfibios.

En la gástrula temprana y media de *A. spurrelli* se observó un blastocele de tamaño reducido. Sin embargo, esta cavidad desaparece completamente a partir del estadio 12.5 en la gástrula tardía de esta rana. Durante la gástrula temprana de *X. laevis*, el blastocele aumenta su volumen y la capa animal se expande uniformemente, incrementando el díametro del embrión debido a la expansión del blastocele (Kay y Peng, 1991). En la gástrula tardía de *X. laevis*, el blastocele se reduce hasta desaparecer casi por completo hacia el final de la gastrulación (Ewald *et al*., 2004). En *G. riobambae*, el blastocele completamente formado se expande considerablemente mientras avanza la gastrulación, ocupando un tercio de la región animal del embrión, generando un incremento en el

tamaño del mismo (del Pino y Loor-Vela, 1990). La expansión del blastocele en *E. machalilla* comienza desde la blástula media, alcanzando su máxima extensión durante la gástrula temprana (del Pino *et al*., 2004). En la gástrula media de *G. riobambae* y *E. machalilla,* el blastocele se encuentra expandido a lo largo del polo animal y en la gástrula tardía se observa únicamente un remanente de esta cavidad (del Pino *et al*., 2004; Moya *et al*., 2007). En la rana de desarrollo directo *E. coqui*, el blastocele tiene un volumen reducido y se encuentra expandido en la gástrula temprana (Ninomiya *et al*., 2001; del Pino *et al*., 2007;). El blastocele de las ranas centrolénidas, alcanza su máxima expansión durante la gástrula temprana y reduce su tamaño mientras avanza la gastrulación (Salazar-Nicholls y del Pino, 2015).

La capa que forma el techo del blastocele, se expande y reduce su número de células durante el movimiento de epíbole (Kay y Peng, 1991). En *A. spurrelli*, se obervó que el techo del blastocele está compuesto por dos capas de células de grosor (Fig. 3B), similar al techo del blastocele en *X. laevis* en este estadio. El techo del blastocele de *G. riobambae* está compuesto por una sola capa de células (Elinson y del Pino, 1985). En *E. machalilla* el techo del blastocele presenta un grosor de tres capas de células en este estadio (del Pino *et al*., 2004), al igual que lo descrito para ranas del género *Engystomps* (Romero-Carvajal *et al*., 2009). En las ranas centrolénidas, el techo del blastocele tiene un grosor de dos capas de células durante la gastrulación (Salazar-Nicholls y del Pino, 2015).

El tamaño del blastocele en *A. spurrelli,* puede estar relacionado a la cantidad de fluido que se encuentra en esta cavidad. El fluido está vinculado probablemente con la maduración de las células en un ambiente físico y fisiológico particular (Nicholas, 1945). Posiblemente, el desarrollo particular de un blastocele pequeño en los embriones de *A. spurrelli* está relacionado a la estrategia reproductiva de esta rana. El hecho de que la hembra inyecte agua a la postura antes de la ovoposición, puede ser un factor que cause

variación en la actividad celular durante el desarrollo. Es necesario realizar estudios sobre la actividad celular en los embriones de *A. spurrelli* en los estadios tempranos de formación del blastocele. Para estos estudios se recomienda usar una pipeta de vidrio que contenga electrodos, con la finalidad de registrar la actividad intracelular por medio del control de flujo de iones del tejido en estudio.

6.1.3 LA EXPANSIÓN DEL ARQUENTERÓN OCURRE EN LA GÁSTRULA TARDÍA EN *A. spurrelli*, A DIFERENCIA DE OTROS ANFIBIOS

La formación del arquenterón inicia durante la gastrulación, la elongación e inflación de esta estructura, son procesos morfogenéticos que ocurren de forma independiente entre ellos (Ewald *et al*., 2004). La elongación del arquenterón es consecuencia de los movimientos de convergencia y extensión dorsales. Uno de los mecanismos que contribuye a la elongación del arquenterón, así como a la expansión de esta estructura, es la propagación de las células de botella al final de la gastrulación (Keller, 1981). Otro mecanismo involucrado en la elongación del arquenterón es el movimiento de las células durante la rotación vegetal (Winklbauer y Schürfeld, 1999). Previos estudios han propuesto que la expansión del arquenterón ocurre mendiante la transferencia de fluido del blastocele hacia esta cavidad (Zotin, 1965; Ewald *et al*., 2004). Se ha sugerido que los movimientos de la gastrulación, principalmente la constricción del blastoporo, ejercen presión hidrostática en el blastocele, forzando a que el fluido de esta cavidad se traslade hacia el arquenterón (Zotin, 1965*).* La elongación e inflación del arquenterón ocurren simultáneamente con la reducción del tamaño del blastocele. En *X.*

laevis, un tabique de células que separa al arquenterón del blastocele, permitirá el paso del fluido del blastocele hacia el arquenterón (Heasman, 2006).

Las especies de ranas estudiadas previamente y *A. spurrelli*, presentan diferencias en la temporalidad en que ocurren los eventos de elongación e inflación del arquenterón durante la gastrulación. En la gástrula temprana de los embriones de *A. spurrelli*, comienza la elongación del arquenterón a lo largo del labio dorsal del blastoporo (Fig. 3D). En los embriones de *X. laevis*, la elongación del arquenterón ocurre también en la gástrula temprana (Ewald *et al*., 2004), al igual que en las ranas del género *Engystomops* (del Pino *et al*., 2007)

En el estadio de gástrula media, el arquenterón de *A. spurrelli* se encuentra alargado, pero no expandido (Fig. 3F). Un patrón similar se observa en la gástrula media de *E. coqui*, en la cual el arquenterón es pequeño y no se ha expandido (Ninomiya *et al*., 2001; del Pino *et al*., 2007). Estas características son diferentes a las descritas en la gástrula media de *X. laevis*. Durante este estadio, el arquenterón de *X. laevis* se expande considerablemente, producto del movimiento de las células vegetales al interior del embrión, al igual que ocurre en *E. coloradorum* (del Pino *et al*., 2007). En la rana marsupial, el arquenterón es de tamaño reducido en la gástrula media y comienza a elongarse en la gástrula tardía, similar a lo observado en *E. machalilla* (del Pino *et al*., 2004; Moya *et al*., 2007).

La expansión del arquenterón en *A. spurrelli* comienza en el estadio 12.5 de la gástrula tardía (Fig. 3H-3I). En este estadio, el arquenterón de *X. laevis* continúa expandiéndose (Ewald *et al*., 2004). En los embriones de *G. riobambae* y *E. machalilla,* el arquenterón se expande durante la gástrula tardía, alcanzando su máxima expansión durante la post-gástrula en *E. machalilla* (del Pino *et al*., 2004). A diferencia de *X. laevis*,

G. riobambae y *E. machalilla* desarrollan un collar circumblastoporal conspicuo, que aparentemente contiene la mayoría de células que involucionaron (Moya *et al*., 2007).

Los estudios realizados con anterioridad, sugieren que existe una relación entre la expansión del arquenterón y la reducción del tamaño del blastocele (Ewald *et al*., 2004). Es posible que en los embriones de *A. spurrelli* el blastocele no esté presente en la gástrula media, debido a que su tamaño reducido involucra una pequeña cantidad de fluido que será trasladada hacia el arquenterón durante la expansión, causando la reducción total de esta cavidad. Probablemente, ocurra algo similar durante la gástrula media donde no se observa expansión del arquenterón, debido a que el tamaño reducido del blastocele evita la expansión progresiva del arquenterón. Es posible que la expansión del arquenterón que se observa en la gástrula tardía, ocurra debido a la actividad metabólica de las células. Probablemente, estas células tienen una función excretora y el líquido que secretan permite la expansión del arquenterón.

6.1.4 EL DESARROLLO EN *A. spurrelli* ES RÁPIDO DE ACUERDO A SU MODO DE GASTRULACIÓN

Las características morfológicas de la gastrulación varían entre especies de acuerdo a su velocidad de desarrollo. Las características observadas en *A. spurrelli*, permitieron la comparación con los modos de gastrulación previamente descritos para otras especies de anfibios. De acuerdo a la velocidad del desarrollo, se han establecido tres patrones de gastrulación para diferentes especies de ranas (Moya *et al*., 2007; Anexo 2, Anexo 5). Las ranas de desarrollo rápido como *X. laevis* y ranas del género *Engystomops*, presentan el primer patrón de gastrulación. La elongación del arquenterón inicia en la gástrula temprana

y el alargamiento del notocordio inicia en la gástrula media en estas especies. En el segundo modo de gastrulación se encuentran las ranas dendrobátidas y *E. coqui*. La elongación del arquenterón inicia de forma tardía en la gástrula media y la elongación del notocordio inicia en la post-gástrula. El tercer modo de gastrulación incluye a *G. riobambae*. En esta especie el alargamiento del arquenterón y del notocordio se retrasan hasta la post-gástrula. Además, esta es la única especie que forma un disco embriónico, característica asociada con el retraso en la elongación del arquenterón y la acumulación de células en el labio dorsal del blastoporo durante la involución (del Pino *et al*., 2007; Moya *et al*., 2007).

La presencia de notocordio se observa en la gástrula tardía en *A. spurrelli*, al igual que en *X. laevis.* De igual forma, el notocordio se observó en este estadio en las ranas centrolénidas y ranas del género *Engystomops* (Ewald *et al*., 2004; del Pino *et al.,* 2007; Salazar-Nicholls y del Pino, 2015).

A pesar de que los eventos de elongación e inflación del arquenterón en *A. spurrelli* no ocurren de manera simultánea, se propone incluir a esta especie dentro de las ranas de desarrollo rápido. En primer lugar, el tiempo en que tarda en finalizar la gastrulación, es menor al descrito en las especies de desarrollo lento, como las ranas dendrobátidas y *G. riobambae*. En segundo lugar, el alargamiento del arquenterón se da inicialmente en la gástrula media, a pesar de que éste no se ha inflado y el notocordio se observa en la gástrula tardía, como en las ranas de desarrollo rápido.

Las divergencias presentes en los modos reproductivas de los anfibios enfatizan el concepto de que el patrón de gastrulación está estrechamente relacionado a la estrategia reproductiva, más no al tamaño del huevo (del Pino *et al*., 2007).

6.1.5 LA RESPUESTA MUSCULAR Y DIFERENCIACIÓN DE LOS SOMITAS EN *A. spurrelli*

La maduración de los somitas en el cuerpo del embrión, genera tres regiones distintas: el esclerotoma, el dermatoma y el miotoma. La miogénesis es el proceso de diferenciación de los mioblastos, células que componen el miotoma, hasta la formación de miotúbulos multinucleados, las células que componen las fibras musculares (Radice *et al.*, 1989). Los procesos de origen y formación del miotoma son altamente variables entre especies (Keller, 1999). En algunas especies de anfibios, el miotoma presenta mioblastos pequeños y redondeados que se intercalan entre sí hasta formar miotubos multinucleados, como es el caso de algunas ranas del género *Engystomops*, ranas dendrobátidas y *G. riobambae* (del Pino *et al*., 2007).

Una vez finalizada la neurulación, el cuerpo de *A. spurrelli* comenzó a alargarse y se observaron los somitas y pronefros, al igual que en *X. laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994). Las tinciones fluorescentes permitieron diferenciar los somitas en el estadio de yema de la cola como paquetes celulares sin aparente ordenamiento celular. Únicamente fue posible diferenciar fibras multinucleadas en los estadios avanzados. Es necesario realizar un análisis diferente para poder determinar el modo de somitogénesis de esta especie.

El estadio de respuesta muscular en *A. spurrelli*, difiere al establecido en *X. laevis* y varias especies de anfibios. Mientras que en *X. laevis* la respuesta muscular se identifica en el estadio 18, los embriones de *A. spurrelli* no presentaron movilidad en este estadio, a pesar de que fueron estimulados mecánicamente. La respuesta muscular se observó desde el estadio 20. Es posible que exista una relación entre la formación de las fibras

multinucleadas en los somitas y el inicio de respuesta muscular en los embriones de *A. spurrelli*. La diferenciación de miotubos multinucleados, que forman las fibras musculares, ocurrió inicialmente en el estadio 20, en el cual se registra la respuesta muscular en *A. spurrelli.*

Con los resultados obtenidos respecto al estadio de respuesta muscular en *A. spurrelli*, se propone elaborar un protocolo de estimulación externa en los embriones, desde el estadio de yema de la cola, involucrando factores como exposición a la luz, humedad y estimulaciones mecánicas que ayuden a comprobar la movilidad en los embriones.

6.1.6 LA EXTENSIÓN DE LAS BRANQUIAS DURANTE LOS ESTADIOS AVANZADOS Y EMBRIÓN A LA ECLOSIÓN DE *A. spurrelli*

En los estadios más avanzados, las branquias comenzaron a desarrollarse. Cada especie presenta un número característico en cuanto a sus ramificaciones branquiales (del Pino *et al*., 2004; Hervas *et al.*, 2015). Las branquias en *A. spurrelli* se desarrollan progresivamente mientras avanza el desarrollo (Figura 7). Esta especie alcanza su máximo desarrollo de branquias en el estadio 23, presentando 12 ramificaciones branquiales en la rama anterior y 6 ramificaciones branquiales en la rama posterior (Fig. 6B-6C). La extensión de las ramas es significativa, con relación a lo observado en *H. fleischmanni*, *E. callistomma* y *E. coloradorum.*

El desarrollo de branquias externas grandes ayuda a captar el oxígeno que se difunde a través de la membrana del huevo en las especies con ovoposición fuera del agua

(Warkentin, 1999). Los embriones de *A. spurrelli* eclosionan con ramificaciones branquiales que han reducido su tamaño (Fig. 6D-6E). En estudios realizados en una especie cercana, *A. callidryas*, se observó que la regresión de las branquias ocurre en un lapso de dos horas una vez que el renacuajo llega al agua (Warkentin, 2000). La regresión de las branquias en los anfibios, es un factor usado para el establecimiento de estadios en las tablas de desarrollo.

En algunas especies de anfibios, la regresión de las branquias puede ser retardada en relación a otros eventos del desarrollo. La disponibilidad de oxígeno puede afectar el desarrollo de las branquias en los anuros, sin embargo, no se han realizado estudios sobre cómo es regulada la pérdida de las branquias (Warkentin, 2000; Salica *et al*., 2011;).

6.1.7 LA PIGMENTACIÓN EN LOS EMBRIONES DE *A. spurrelli* DIFIERE EN COMPARACIÓN A OTROS ANFIBIOS

La pigmentación en el hemisferio animal de los huevos de los anfibios es considerada una adaptación a la protección contra la radiación UV (Blaustein y Belden, 2003). Las especies que se desarrollan en áreas abiertas, tienden a depositar huevos con pigmentación oscura, como las ranas dendrobátidas (del Pino *et al*., 2004); en contraste los huevos despigmentados se observan en especies que se desarrollan en el envés de las hojas, como *Hyalinobatrachium fleischmanni*, o en nidos de espuma como las ranas del género *Engystomops* (Romero-Carvajal *et al*., 2009; Salazar-Nicholls y del Pino, 2015). En *A. spurrelli* se evidencia el pigmento celular, además de gránulos de pigmento alrededor de los núcleos, como lo descrito para *Engystomops coloradorum* y *E. randi* (Romero-Carvajal *et al*., 2009). En *X. laevis*, los gránulos de pigmento en el hemisferio animal son

determinados en la oogénesis. La proteína reguladora del transporte de melanosoma, Shroom 2, desempeña un rol fundamental en inducir gránulos de pigmento en los oocitos y blastómeros de esta rana (Lee *et al*., 2009). Los oocitos de la rana *Engystomops pustulosus* contienen pequeñas cantidades de la proteína Shroom 2 y son de color blanco (Romero-Carvajal *et al*., 2009), a diferencia de *X. laevis*, que contiene cantidades elevadas de esta proteína y su embrión es pigmentado (Lee *et al*., 2009).

El huevo de *A. spurrelli* presenta pigmentación en el polo animal desde que es fertilizado hasta el estadío de néurula tardía, donde este pigmento desaparece. Sin embargo, la distribución del pigmento difere de la observada en los embriones de *X. laevis.* Durante los estadios de blástula y gástrula de *A. spurrelli*, el pigmento está distribuido únicamente en una región superior del polo animal, mientras que en *X. laevis* la pigmentación se extiende hasta la mitad del embrión (Anexo 4). En el estadio de blástula tardía, el pigmento celular en *A. spurrelli.* La mayor diferencia en la distribución del pigmento en *A. spurrelli* y *X. laevis* se observa durante los estadio de gástrula. En la gástrula temprana de *A. spurrelli*, el pigmento se delimita en la parte superior del polo animal. Durante el estadio de gástrula media y tardía en *X. laevis*, el pigmento rodea la mayoría del embrión, a diferencia de *A. spurrelli*, donde se observa la pigmentación restringida en una parte del hemisferio animal. Es necesario realizar un análisis molecular con la proteína Shroom2 en los embriones de *A. spurrelli*, para poder determinar el nivel de expresión de esta proteína, a fin de comparar los resultados con los previamente descritos para otras especies de anfibios.

6.2 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los embriones de *A. spurrelli* se desarrollan de una forma que es claramente divergente del patrón de desarrollo descrito para otros anfibios. Estas diferencias pueden deberse a factores como la cantidad de yema en el huevo y el clivaje retardado de las células vegetales, en comparación con las animales. Es importante recalcar que a pesar de existir diferencias en las características de los embriones de *A. spurrelli*, los mecanismos básicos de desarrollo son similares al de *X. laevis*. Es conveniente realizar estudios en huevos de anfibios que poseen una gran cantidad de yema, para poder ratificar las variaciones en el desarrollo de estas especies. Al igual, se recomienda elaborar un análisis exhaustivo sobre la formación e importancia del blastocele en esta especie, ya que la divergencia de su tamaño, parece no afectar el producto final de la gastrulación de esta rana.

Estudios comparativos detallados sobre la embriología de diferentes familias de anfibios, son importantes para entender la evolución del desarrollo en los anuros. Por esta razón se sugiere analizar el desarrollo temprano de otras especies de la familia Hylidae y del género *Agalychnis*, para comparar los resultados obtenidos en el presente estudio.

7. LITERATURA CITADA

Arendt, D., y Nübler-Jung, K. 1999. Rearranging gastrulation in the name of yolk: Evolution of gastrulation in yolk-rich amniote eggs. Mech. Dev. *81*, 3–22.

Bauer, D. V, Huang, S., y Moody, S. 1994. The cleavage stage origin of Spemann's Organizer: analysis of the movements of blastomere clones before and during gastrulation in *Xenopus*. Development *120*, 1179–1189.

Benítez, M.S., y del Pino, E.M. 2002. Expression of brachyury during development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. Dev. Dyn. *225*, 592–596.

Blaustein, R., y Belden, L.K. 2003. Amphibian defenses against UV-B radiation. Evol. Dev. *5*, 89–97.

Carroll, E.J., y Hedrick, J.L. 1974. Hatching in the toad Xenopus laevis: morphological events and evidence for a hatching enzyme. Dev. Biol. *38*, 1–13.

Chipman, A.D. 2002. Variation, plasticity and modularity in anuran development. Zoology. *105*, 97–104.

del Pino, E.M. 1989. Modifications of oogenesis and development in marsupial frogs. Development *107*, 169–187.

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

del Pino, E.M., y Loor-Vela, S. 1990. The pattern of early cleavage of the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. Development *110*, 781–789.

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*. Int. J. Dev. Biol. *48*, 663–670.

del Pino, E.M., Venegas-Ferrín, M., Romero-Carvajal, A., Montenegro-Larrea, P., Sáenz-Ponce, N., Moya, I.M., Alarcón, I., Sudou, N., Yamamoto, S., y Taira, M. 2007. A comparative analysis of frog early development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 11882–11888.

Delia, J., Cisneros-Heredia, D.F., Whitney, J., y Murrieta-Galindo, R. 2010. Observations on the Reproductive Behavior of a Neotropical Glassfrog, *Hyalinobatrachium fleischmanni* (Anura: Centrolenidae). South Am. J. Herpetol. *5*, 1–12.

Duellman, W.E., y Trueb, L. 1986. Biology of Amphibians: Reproductive strategies. Mc Grawn Hill Book Company. New York.

Elinson, R.P. 2011. Cleavage and Gastrulation in *Xenopus laevis* Embryos. eLS. 1–9.

Elinson, R.P., y del Pino, E.M. 1985. Cleavage and gastrulation in the egg-brooding, marsupial frog, *Gastrotheca riobambae*. J. Embryol. Exp. Morphol. *90*, 223–232.

Elinson, R.P., y Beckham, Y. 2002. Development in frogs with large eggs and the origin of amniotes. Zoology *105*, 105–117.

Elinson, R. P., y del Pino, E. M. 2012. Developmental Diversity of Amphibians. Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology *1*, 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 *131*, 6195–6209.

Fang, H., Marikawa, Y., y Elinson, R.P. 2000. Ectopic expression of *Xenopus* noggin RNA induces complete secondary body axes in embryos of the direct developing frog *Eleutherodactylus coqui*. Dev. Genes Evol. *210*, 21–27.

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

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*, 3687–3700.

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

Greene, N.D.E., y Coop. A.J. 2009. Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. Prenat. Diagn. *26*, 980–984.

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*, 207.

Hanken, J. 1993. Model systems versus outgroups alternative approaches to the study of head development and evolution. Integr. Comp. Biol. *33*, 448–456.

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

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

Kalt, M.R. 1971. The relationship between cleavage and blastocoel formation in *Xenopus laevis*. I. Light microscopic observations. J. Embryol. Exp. Morphol. *26*, 37–49.

Kay, B.K., y Peng, H.B. 1991. Methods in Cell Biology. *Xenopus laevis*: Practical uses in Cell and Molecular Biology. Academic Press. San Diego, California.

Keller, R. 1999. Somitogenesis Part 1. Curr. Top. Dev. Biol. *47*, 183–246.

Keller, R.E. 1981. An experimental analysis of the role of bottle cells and the deep marginal zone in gastrulation of *Xenopus laevis*. J. Exp. Zool. *216*, 81–101.

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

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. Dev. Genes Evol. *219*, 319–330.

Moya, I.M., Alarcón, I., y del Pino, E.M. 2007. Gastrulation of *Gastrotheca riobambae* in comparison with other frogs. Dev. Biol. *304*, 467–478.

Nicholas, J. S. 1945. Blastulation, its role in pregastrular organization in *Amblystoma punctatum*. R.I.N. *44*, 265–299.

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

Ninomiya, H., Zhang, Q., y Elinson, R.P. 2001. Mesoderm Formation in *Eleutherodactylus coqui*: Body Patterning in a Frog with a Large Egg. Dev. Biol. *236*, 109–123.

Ortega-Andrade, H. M., y Tobar-Suárez, C., Arellano, M. 2011. Tamaño poblacional, uso del hábitat y relaciones interespecíficas de *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae) en un bosque húmedo tropical remanente del Noroccidente del Ecuador. Papéis Avulsos de Zoologia *51*, 1–19.

O'Rourke, D.P. 2007. Amphibians used in research and teaching. ILAR J. *48*, 183–187.

Pyburn, W. F. 1970. Breeding behavior of the leaf-frogs *Phyllumedusa callydras* and *Phyllomedusa dacnicolor* in México. Copeia *2*, 209-218.

Radice, G.P., Neff, a. W., Shim, Y.H., Brustis, J.J., y Malacinski, G.M. 1989. Developmental histories in amphibian myogenesis. Int. J. Dev. Biol. *33*, 325–343.

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

Ryan, M.J., Bartholomew, G., y Rand, S. 2012. Energetics of Reproduction in a Neotropical Frog , *Physalaemus pustulosus.* Ecological Society of America *64*, 1456–1462.

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 callistomma* (Anura :Centrolenidae) from cleavage to tadpole hatching. Amphibian and Reptile Conservation *8*, 89–106.

Salica, M.J., Haad, M.B., Candioti, F.V., y Faivovich, J. 2011. Early development of two species of *Phyllomedusa* (Anura: Phyllomedusinae). Salamandra *47*, 144–154.

Sánchez, D. 2010. Larval Development and Synapomorphies for Species Groups of Hyloscirtus Peters, 1882 (Anura: Hylidae: Cophomantini). Copeia *3*, 351–363.

Savage, M. J. 2002. The amphibians and reptiles of Costa Rica. A herpetofauna between two continents, between two seas. Chicago University Press. Chicago, United States. 954 pp.

Sayim, F., y Kaya, U. 2008. Embryonic development of the tree frog, Hyla arborea. Biologia. *63*, 588–593.

Scott, N. J. Jr. y Starrett. A. 1972. An unusual breeding aggregation of frogs, with notes on the ecology of *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae). Bulletin of Southern California Academy of Science *73*, 86-94.

Stableford, L. T. 1949. The blastocoel fluid in amphibian gastrulation. Journal of Experimental Zoology *112*, 529-546.

Vargas-Salinas, F., Bolaños-E. L. M. y Berrio-B. H. 2000. Notas sobre la ecología reproductiva de *Agalychnis spurrelli* (Anura: Hylidae) en una población de Anchicayá, Pacífico colombiano. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas *24*, 85-99.

Vargas, F., y Gutiérrez, P. 2005. Cambios morfológicos y mortalidad en embriones y renacuajos de *Agalychnis spurrelli* Boulenger (Anura: Hylidae). Actual. Biol. *27*, 189–202

Vargas-Salinas. F., y Torres, O. L. 2013. *Agalychnis spurrelli* Rana arbórea planeadora. Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia *1*, 19-25.

Warkentin, K.M. 1999. Effects of hatching age on development and hatchling morphology in the red eyed tree frog, Agalychnis callidryas. Biol. J. Linn. Soc. *68*, 443–470.

Warkentin, K. 2000. Environmental and Developmental Effects on External Gill Loss in the Red-Eyed Tree Frog, *Agalychnis callidryas*. Physiological and Biochemical Zoology *73*, 557-565.

Wells, K. D. 2007. Ecology and Behavior of Amphibians. Chicago & London: The University of Chicago Press. 1400 pp.

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

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

Zotin, A.I. 1965. The uptake and movement of water in the embryo. Symp Soc. Exp. Biol. *19*, 365–384.

8. FIGURAS

Figura 1. El clivaje en *A. spurrelli* es irregular. Morfología del clivaje: A, B, C, D, E, F, G, H, I, K y L son vistas animales. J es una vista lateral. Las flechas en colores, corresponden a cada división del clivaje representado en el Anexo 3 para *A. spurrelli*. (A) Huevo fertilizado. Diámetro del huevo 2.9 mm. (B-E) El surco inicial del primer clivaje se extiende a lo largo del huevo en el polo animal. (F) El embrión en primer clivaje. (G) El surco inicial del segundo clivaje está orientado horizontalmente. (H-I) Los surcos del tercer clivaje son paralelos al primer surco del clivaje. (J) El embrión de 10 células se divide de forma irregular en el polo animal. (K) El embrión en estadio de 16 células. (L) El embrión en estadio de 32 células presenta un patrón irregular de clivaje. El tiempo indicado en cada imagen en horas y minutos (HH:MM) representa el tiempo transcurrido entre cada evento del clivaje. Las barras corresponden a 500 µm.

Figura 2. El blastocele es reducido en la blástula de *A. spurrelli*. Morfología de los estadios de blástula de células grandes, medianas y pequeñas (estadio 7, 8 y 9): A es una vista desde el polo animal. B y D son vistas laterales. El esquema a la izquierda de B y D muestra el sitio de corte de cada embrión. (A) Vista externa de la blástula de células grandes. (B) Vista externa de la blástula de células medianas de *A. spurrelli*. La flecha señala el pigmento alrededor de los núcleos. (C) En la sección sagital de la blástula de células medianas no se observó la presencia de blastocele. Se observaron espacios intercelulares, señalados con las flechas amarillas. La flecha blanca señala el pigmento alrededor de los núcleos. El hemisferio animal de la sección sagital está orientado hacia arriba. (D) Vista externa de la blástula de células pequeñas. La flecha señala el pigmento alrededor de los núcleos. (E) La sección sagital de la blástula de células pequeñas, muestra un blastocele de tamaño reducido, presente a partir de este estadio. La flecha señala el pigmento alrededor de los núcleos. Las barras en A, B, C, D y E corresponden a 500 µm.

b= blastocele

Figura 3. Alargamiento del arquenterón y blastocele reducido en la gástrula de *A. spurrelli*. Morfología de la gástrula temprana media, tardía y post-gástrula (estadio 10, 11, 12, 12.5, 12.75 y 13): A es una vista lateral, C es una vista lateral desde el lado dorsal del embrión. E, G, I son vistas posteriores con el lado dorsal orientado hacia arriba. El esquema a la izquierda de B, D, F, H y J indica el sitio de corte del embrión. (A) Al inicio de la gastrulación se observó el labio dorsal del blastoporo en la gástrula temprana. (B) La sección sagital de la gástrula temprana muestra un blastocele reducido. El labio dorsal del blastoporo está orientado a la derecha. (C) Vista externa de la gástrula temprana. (D) Se observa el labio dorsal del blastoporo a la derecha y el labio ventral hacia la izquierda. (E) Vista externa de la gástrula media. (F) La sección sagital de la gástrula media muestra el alargamiento del arquenterón. La flecha señala el cleft de Brachet. El tapón de yema está orientado hacia abajo. (G) Vista externa de la gástrula tardía. La flecha señala el surco neural. (H) El arquenterón está inflado y alargado, mientras que no se observa blastocele en la bisección sagital de la gástrula tardía. El tapón de yema está orientado hacia la derecha. (J) El blastocele está ausente en la bisección sagital y el arquenterón se muestra inflado y alargado. (K) Vista externa de la post-gástrula. Se observa la placa neural y el blastoporo cerrado. La flecha señala el surco neural. (L) La bisección sagital muestra el arquenterón de tamaño reducido con respecto al estadio anterior. El blastoporo está orientado hacia la derecha Las barras en A, B. C, D, E, F, G, H, I y K corresponden a 500 µm y las barras en J y L corresponde a 200 µm.

a= arquenterón, b= blastocele, bp= blastoporo, ld= labio dorsal, lv= labio ventral, p= placa neural, ty= tapón de yema

Figura 4. Formación del notocordio al final de la gástrula y formación de los pliegues neurales en la néurula de *A. spurrelli*. Morfología de néurula temprana, media y tardía (estadio 14, 15 y 16): La región rostral en A, C, E y G está orientada hacia arriba. Los esquemas en B, D, F y H señalan la orientación de la sección transversal. (A) Vista externa de la gástrula tardía. B, D, F, H: secciones teñidas para fluorescencia de núcleos. (B) El notocordio se formó al final de la gastrulación (estadio 12.75). En la sección transversal se observa el ectodermo, mesodermo paraxial y endodermo. (C) Vista externa de la néurula temprana. Los pliegues neurales se forman desde este estadio. (D) En la sección transversal de la néurula temprana se observó la placa neural, el notocordio, el mesodermo paraxial y el endodermo. (E) Vista externa de la néurula media de *A. spurrelli*. Se observa la placa neural, los pliegues neurales y el surco neural. (F) El notocordio, los pliegues neurales y el mesodermo paraxial se observaron en una sección transversal de la néurula media. (G) Vista externa de la néurula tardía. (H) Sección transversal de la néurula tardía se observó el tubo neural, los pliegues neurales y el notocordio. Las barras en A, C, E y G corresponden a 500 µm y las barras en B, D, F y H corresponden a 200 µm.

bp= blastoporo, e= ectodermo, en= endodermo, mp= mesodermo paraxial, n= notocordio, p= placa neural, pn= pliegues neurales, tn= tubo neural

Figura 5. Estadios avanzados y desarrollo de las branquias en *A. spurrelli*. Morfología del estadio de yema de la cola y del desarrollo de las branquias (estadio 17, 18, 19 y 21): (A-H) La región rostral está orientada a la izquierda. A es una vista dorsal. C, D y G son vistas laterales. B, D, F, H: secciones teñidas para fluorescencia de núcleos. El esquema señala la orientación de las secciones horizontales que se muestran en B, D, F y H. (A) Embrión entero en el estadio de yema de la cola. Se observan los arcos branquiales y la yema de la cola. (B) En la sección horizontal del estadio de yema de la cola se observan los somitas. (C) Embrión entero en el estadio de yema de la cola. Se observan los somitas, los arcos branquiales y los pronefros. (D) La sección horizontal del estadio de yema de la cola muestra los somitas. (E) Las branquias se desarrollan desde el estadio 19. Se observa la rama anterior de las branquias con 5 ramificaciones. (F) Los somitas se observaron en la sección horizontal del estadio de desarrollo de las branquias. (G) En el estadio 21, la rama anterior de las branquias presentan 9 ramificaciones. (H) En la sección horizontal del estadio 21, se observaron fibras multinucleadas, que se forman a partir de este estadio. La barra en A corresponde a 500 µm, la barra en B corresponde a 200 µm, las barras en C, E y G corresponden a 1000 µm y las barras en D, F y H corresponden a 100 µm.

ab= arcos branquiales, pr= pronefros, ra= ramificación anterior, s= somita

Figura 6. Extensión máxima de las branquias y embrión a la eclosión de *A. spurrelli*. Morfología del estadio de desarrollo completo de las branquias y embrión a la eclosión (estadio 22, 23 y 24): A, B, C y D son vistas laterales. E es una vista ventral de la cabeza. (A) Embrión entero en el estadio de desarrollo de las branquias. La rama anterior de las branquias presenta 10 ramificaciones y la rama posterior posee 5 ramificaciones. (B) Embrión entero que presenta la máxima ramificación de las branquias. La rama anterior presenta 12 ramificaciones y la rama posterior 7 ramificaciones. (C) Acercamiento del embrión en su máxima extensión de las branquias. Se observan las ramificaciones anterior y posterior. (D) El embrión eclosiona con ramificaciones branquiales que han reducido su tamaño. Se observa la aleta caudal. (E) Acercamiento del embrión a la eclosión que se muestra en D. Se observa el opérculo. La rama anterior de las branquias tiene 5 ramificaciones y la posterior 3 ramificaciones. Las barras en A, B, C y D corresponden a 1000 µm y la barra en E corresponde a 500 µm.

ac= aleta caudal, op= opérculo, ra= ramificación anterior, rp= ramificación posterior

Figura 7. Desarrollo de las branquias en *A. spurrelli:* (A) Estadio 19. La rama anterior de las branquias presenta 5 ramificaciones y la posterior posee 2 pequeñas ramificaciones. (B) Estadio 20. La rama anterior de las branquias posee 7 ramificaciones y la posterior presenta 3 ramificaciones. (C) Estadio 21. La rama anterior presenta 9 ramificaciones y la posterior 4. (D) Estadio 22. La rama anterior de las branquias presenta 10 ramificaciones y la rama posterior posee 6 ramificaciones. (E) Estadio 23. Máxima extensión de las branquias. La rama anterior presenta 12 ramificaciones y la rama posterior posee 7 ramificaciones. (F) Estadio 24. Eclosión del renacuajo. Las ramificaciones branquiales han reducido su tamaño notablemente. La rama anterior posee 5 ramificaciones pequeñas y la rama posterior posee 3 ramificaciones pequeñas.

9. TABLAS

Tabla 1. Promedio del diámetro de huevo de *A. spurrelli*

Estadio	Embriones medidos	Diámetro
Huevo	1	2,9
	2	2,9
	3	3,1
	4	2,7
	Promedio	**2,9**
7	1	2,9
	2	2,8
	3	2,9
	Promedio	**2,9**
8	1	2,8
	2	2,8
	3	2,7
	Promedio	**2,8**
	Total	**2,9**
	Desviación estándar	0,101635

Los embriones medidos corresponden a diferentes posturas

Tabla 2. Tiempo del desarrollo en horas y minutos de los embriones de *A. spurrelli* para cada postura.

Postura	**As-001**	**As-002**	**As-003**	**As-005**
Fecha de incio de las observaciones	19/08/2014	28/08/2014	08/09/2014	12/05/2014
Fecha eclosión	30/09/2014	09/09/2014	17/09/2014	22/05/2014
Estadio				
1	00:00[1]			
2	02:15			
3	02:30			
4	02:54	00:00		
5	03:35			
6	04:45	02:20		
7	07:55	04:55		00:00
8	11:00	08:35	00:00	4:40
9	16:30	13:45	04:30	6:40
10	25:00	22:30	11:30	13:40
11	28:30	25:30	15:30	18:10
12	34:00	29:00	20:00	23:40
13	44:30	36:20	28:30	33:10
14	53:30	45:30	37:00	42:00
15	57:30	50:00	43:00	48:30
16	67:30	59:50	52:30	60:00
17	103:00	94:20	82:00	90:30
18	119:00	111:00	96:30	
19	130:00	122:00	108:00	
20	142:00	133:30	120:00	123:00
21	165:00	157:40		142:00
22	169:00	165:30		153:30
23	212:30	207:00	190:00	198:00
24	283:00	278:00	216:30	240:00
Tiempo en días	11.79	11.58	9	10

[1]00:00 es el tiempo inicial del registro en el estadio correspondiente

Tabla 3. Tiempo de gastrulación de *A. spurrelli*

	Estadio	**Tiempo**[1]
Inicio de la gastrulación	10	0,00
	11	3,45
	12	8,45
	12,5	12,52
Final de la gastrulación	13	19,47
Total		**19,47**

[1]Tiempo en horas y fracciones de horas

Tabla 4. Estadios del desarrollo de *A. spurrelli* en comparación a la tabla de desarrollo de *X. laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994) y la tabla general del desarrollo de anfibios Gosner (1960)

Estadios *A. spurrelli*	Estadios *X. laevis*	Estadios Gosner	Características de los embriones de *A. spurrelli*
1	1	1	Fertilización
2	2	3	Embrión de 2 células
3	3	4	Embrión de 4 células
4	4	5	Embrión de 8 células
5	5	6	Embrión de 16 células
6	6	6	Embrión de 32 células
7	7	7	Blástula de células grandes
8	8	8	Blástula de células medianas
9	9	9	Blástula de células pequeñas
10	10	10	Formación del labio dorsal del blastoporo. Gástrula temprana
11	11	10	Tapón de yema grande
12	12	11	Gástrula media. Tapón de yema mediano
12.5	12.5	12	Gástrula tardía. Tapón de yema pequeño
13	13	13	Post-gástrula. Tapón de yema reducido.
14	14	14	Néurula temprana
15	16	15	Néurula media
16	20	16	Néurula tardía. Formación del tubo neural
17	24	17	Yema de la cola
18	26	18	Yema de la cola. Yema de las branquias
19	33-35	19	Ramificación de las branquias. Rama anterior 5 ramificaciones, rama posterior 3 ramificaciones
20	33-40	20	Branquia anterior con 7 ramificaciones, branquia posterior con 3 ramificaciones
21	41	21	Branquia anterior con 9 ramificaciones, branquia posterior con 5 ramificaciones
22	41	22	Branquia anterior con 10 ramificaciones, branquia posterior con 6 ramificaciones
23	41	23	Máxima extensión de las branquias. Branquia anterior 12 ramificaciones, branquia posterior 6 ramificaciones
24	41	25	Eclosión. Algunos embriones eclosionan con una branquia pequeña con 5 ramificaciones en la rama anterior y 3 en la rama posterior

10.ANEXOS

Anexo 1. Posturas obtenidas de *A. spurrelli*

Código postura	Fecha de obtención	Estadio de llegada de los embriones	Número de huevos por postura
As-001	19/08/2015	0	35
As-002	28/08/2015	2	80
As-003	08/09/2014	8	70
As-005	12/05/2015	7	30
		Total de embriones obtenidos	215

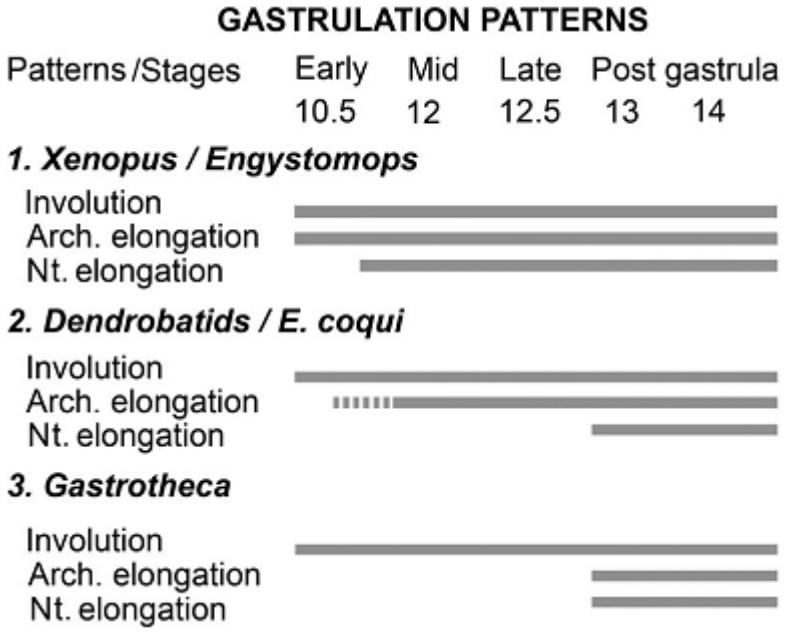
Anexo 2. Comparación del diámetro del huevo, tiempo de gastrulación y tiempo de desarrollo de *A. spurrelli* con otras especies de anfibios

Especie	Tamaño del huevo	Tiempo de gastrulación[1]	Tiempo de desarrollo[2]	Estrategia reproductiva	Referencia
Leptodactylidae					
Engystomops randi	1,1	11 horas	24 horas	Nido de espuma	Romero *et al.*, 2007
Pipidae					
Xenopus laevis	1,2	5,75 horas	14 horas	Acuático	Nieuwkoop y Faber, 1994
Dendrobatidae					
Epipedobates machalilla	1,6	65 horas	19 días	Nidos terrestres	del Pino *et al*., 2004
Centrolenidae					
Espadarana callistomma	2,1	22 horas	12 días	Haz de las hojas	Salazar y del Pino, 2015
Hyalinobatrachium fleischmanni	2,1	24 horas	6 días	Envés de las hojas	
Hylidae					
Agalychnis spurrelli	**2,9**	**20 horas**	**11 días**	**Haz de las hojas**	
Hemiphractidae					
Gastrotheca riobambae	3	168 horas	336 horas	Bolsa marsupial	del Pino y Escobar, 1981

[1]Tiempo de gastrulación es el tiempo que tardan los embriones desde la formación del labio dorsal hasta el cierre del blastoporo.
[2]Tiempo de desarrollo es el tiempo que tardan los embriones desde la fertilización hasta la eclosión del renacuajo.

Anexo 3. Patrón de clivaje en *A. spurrelli, G. riobambae, X. laevis* e *H. arborea:* En *A. spurrelli* el patrón del clivaje es irregular, similar a lo observado en *G. riobambae*. El patrón del clivaje en *H. arborea,* es semejante al documentado para *X. laevis* y distinto al descrito para *A. spurrelli.* Las líneas púrpura indican la primera división celular, correspondiente al primer clivaje. Las líneas en verde corresponden al segundo clivaje. Las líneas en azul representan el tercer clivaje. En *A. spurrelli* y *G. riobambae* corresponden también al estadio de 10 blastómeros. El esquema en rojo representa el estadio de 16 células. El esquema en naranja corresponde al estadio de 32 células. El estadio 8 y 9 se representan en esquemas amarillos y cafés respectivamente.

Anexo 4. Presencia de blastocele, arquenterón y pigmento en la blástula y gástrula de *A. spurrelli* en comparación con *X. laevis*: El tapón de yema está orientado hacia abajo hasta el estadio 12 (gástrula media) y la gástrula tardía el tapón de yema está orientado hacia la derecha. En el estadio de blástula de células medianas (estadio 8) en *A. spurrelli*, el blastocele está ausente, a diferencia de *X. laevis*, que presenta un blastocele de tamaño reducido. La línea púrpura señala el pigmento en el polo animal. El blastocele aparece en el estadio de blástula de células pequeñas (estadio 9) en *A. spurrelli*. El blastocele de *X. laevis*, se encuentra completamente expandido en el estadio 10. Se observa el pigmento a lo largo de casi toda la región animal. En la blástula temprana de *A. spurrelli* el blastocele es de tamaño reducido (estadio 10 y 11). Se observa pigmento solo en una región del polo animal. La elongación del arquenterón comienza en la blástula temprana en *X. laevis* (estadio 11). El blastocele reduce su tamaño. La pigmentación avanza a lo largo del embrión. En la gástrula media en *X. laevis* el arquenterón se ha inflado y el blastocele ha reducido su tamaño. El pigmento rodea todo el embrión, a excepción del tapón de yema. En *A. spurrelli* el arquenterón se observa alargado, pero no se ha inflado. El blastocele es de tamaño reducido. En la gástrula tardía, el arquenterón se ha expandido en *A. spurrelli* al igual que en *X. laevis*, sin embargo, en *A. spurrelli* no se observa blastocele. En la gástrula tardía de *A. spurrelli*, el arquenterón alcanza su máxima expansión. En *X. laevis*, el arquenterón se encuentra expandido y el blastocele ha desparecido casi por completo.



Anexo 5. Patrones de gastrulación en especies de desarrollo rápido y lento: Tres patrones de gastrulación se han descrito de acuerdo a la velocidad del desarrollo y tiempo de ocurrencia de los procesos. Las barras indican el comienzo de la involución, elongación del arquenterón y notocordio en cada patrón. (Tomado de del Pino *et al*., 2007).

Anexo 6. Lista de fotografías y créditos

Figura	Negativo	Especie	Iluminación	Fecha	Crédito
1A	SNAP-121903-0019	*A. spurrelli*	Luz directa	19/Agosto/2014	A.B. Carrillo
1B	SNAP-124035-0024	*A. spurrelli*	Luz directa	19/Agosto/2014	A.B. Carrillo
1C	SNAP-125017-0025	*A. spurrelli*	Luz directa	19/Agosto/2014	A.B. Carrillo
1D	SNAP-130646-0029	*A. spurrelli*	Luz directa	19/Agosto/2014	A.B. Carrillo
1E	SNAP-131700-0033	*A. spurrelli*	Luz directa	19/Agosto/2014	A.B. Carrillo
1F	SNAP-133046-0036	*A. spurrelli*	Luz directa	19/Agosto/2014	A.B. Carrillo
1G	SNAP-141154-0056	*A. spurrelli*	Luz directa	19/Agosto/2014	A.B. Carrillo
1H	SNAP-152357-0067	*A. spurrelli*	Luz directa	19/Agosto/2014	A.B. Carrillo
1I	SNAP-163800-0079	*A. spurrelli*	Luz directa	19/Agosto/2014	A.B. Carrillo
1J	SNAP-170936-0083	*A. spurrelli*	Luz directa	19/Agosto/2014	A.B. Carrillo
1K	SNAP-181918-0109	*A. spurrelli*	Luz directa	19/Agosto/2014	A.B. Carrillo
1L	SNAP-190613-0123	*A. spurrelli*	Luz directa	19/Agosto/2014	A.B. Carrillo
2A	SNAP-161106-0014	*A. spurrelli*	Luz directa	28/Agosto/2014	A.B. Carrillo
2B	SNAP-103031-0006	*A. spurrelli*	Luz directa	28/Agosto/2014	A.B. Carrillo
2C	IMG-62	*A. spurrelli*	Luz directa	12/Agosto/2015	A.B. Carrillo
2D	SNAP-124756-0022	*A. spurrelli*	Luz directa	17/Agosto/2014	A.B. Carrillo
2E	SNAP-161820-0005	*A. spurrelli*	Luz directa	17/Agosto/2014	A.B. Carrillo
3A	SNAP-165708-0011	*A. spurrelli*	Luz directa	17/Agosto/2014	A.B. Carrillo
3B	IMG-586	*A. spurrelli*	Luz directa	20/Mayo/2015	A.B. Carrillo
3C	SNAP-163327-0034	*A. spurrelli*	Luz directa	15/Octubre/2014	A.B. Carrillo
3D	IMG-17	*A. spurrelli*	Luz directa	4/Junio/2015	A.B. Carrillo
3E	SNAP-105641-0018	*A. spurrelli*	Luz directa	18/Septiembre/2014	A.B. Carrillo
3F	IMG-260	*A. spurrelli*	Luz directa	22/Julio/2015	A.B. Carrillo
3G	SNAP-110905-0027	*A. spurrelli*	Luz directa	25/Julio/2014	A.B. Carrillo
3H	IMG-807	*A. spurrelli*	Luz directa	10/Septiembre/2015	A.B. Carrillo
3I	SNAP-164820-0041	*A. spurrelli*	Luz directa	25/Julio/2014	A.B. Carrillo
3J	IMG-820	*A. spurrelli*	Luz directa	10/Septiembre/2015	A.B. Carrillo
3K	SNAP-095144-0010	*A. spurrelli*	Luz directa	25/Julio/2014	A.B. Carrillo
3L	IMG-829	*A. spurrelli*	Luz directa	10/Septiembre/2015	A.B. Carrillo
4B	IMG-144	*A. spurrelli*	Luz directa	16/Junio/2015	A.B. Carrillo
4C	SNAP-110756-0077	*A. spurrelli*	Luz directa	8/Octubre/2014	A.B. Carrillo
4D	SNAP-112729-0057	*A. spurrelli*	Fluorescencia	5/Febrero/2015	A.B. Carrillo
4E	SNAP-110259-0069	*A. spurrelli*	Luz directa	8/Octubre/2014	A.B. Carrillo
4F	ExtendedFocusGrabImage	*A. spurrelli*	Fluorescencia	5/Febrero/2015	A.B. Carrillo
4G	SNAP-113319-0085	*A. spurrelli*	Luz directa	8/Octubre/2014	A.B. Carrillo
4H	ExtendedFocusGrabImage3	*A. spurrelli*	Fluorescencia	11/Febrero/2015	A.B. Carrillo
5A	SNAP-122422-0120	*A. spurrelli*	Luz directa	8/Octubre/2014	A.B. Carrillo
5B	SNAP-153953-0043	*A. spurrelli*	Fluorescencia	5/Marzo/2015	A.B. Carrillo
5C	SNAP-100752-0023	*A. spurrelli*	Luz directa	13/Octubre/2014	A.B. Carrillo
5D	SNAP-160900-0096	*A. spurrelli*	Fluorescencia	11/Junio/2015	A.B. Carrillo
5E	SNAP-103210-0040	*A. spurrelli*	Luz directa	13/Octubre/2014	A.B. Carrillo

5F	SNAP-130400-0057	*A. spurrelli*	Fluorescencia	11/Junio/2015	A.B. Carrillo
5G	SNAP-113054-0079	*A. spurrelli*	Luz directa	13/Octubre/2014	A.B. Carrillo
5H	SNAP-163740-0151	*A. spurrelli*	Fluorescencia	11/Junio/2015	A.B. Carrillo
6A	SNAP-120214-0106	*A. spurrelli*	Luz directa	13/Octubre/2014	A.B. Carrillo
6B	SNAP-155449-0004	*A. spurrelli*	Luz directa	13/Octubre/2014	A.B. Carrillo
6C	SNAP-161959-0016	*A. spurrelli*	Luz directa	13/Octubre/2014	A.B. Carrillo
6D	SNAP-170248-0049	*A. spurrelli*	Luz directa	15/Octubre/2014	A.B. Carrillo
6E	SNAP-172153-0055	*A. spurrelli*	Luz directa	15/Octubre/2014	A.B. Carrillo