

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Morfología de los embriones de *Hyloxalus vertebralis* (Anura: Dendrobatidae)
desde el clivaje hasta la eclosión del renacuajo y análisis en la estructura de la
gástrula

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

KARINA PAMELA TORRES MONTAÑO

Quito, 2014

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 Karina Pamela Torres Montaña ha sido conducida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Lic. Francisca Hervas Sotomayor

Directora de la Disertación

Quito, 30 de Abril de 2014

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por apoyar la realización de este trabajo. A pesar de adversidades presentadas, estuvieron cerca, con palabras de aliento e inspiración. En especial quiero agradecer a mi madre y padre por la guía para seguir la carrera de biología y permitir mi desarrollo personal y profesional.

A la Doctora Eugenia del Pino, por la guía y su valioso aporte en la elaboración de esta investigación. Gracias por las lecciones de vida enseñadas, las mismas que servirán al futuro de mi vida profesional. Sus experiencias inspiran a conocer más sobre el mundo de la ciencia y la investigación.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por las becas de investigación otorgadas a la Dra. del Pino. Al personal del Centro de Investigación y Conservación de Anfibios (CICA), por la donación de los embriones utilizados para la realización de la presente investigación.

A todos los miembros del Laboratorio de Biología del Desarrollo, por brindar su ayuda y amistad. Especialmente quiero agradecer a Natalia Sáenz, Andrés Garcés, Alexandra Vargas y María José Salazar, por su apoyo incondicional y consejos para la preparación de la disertación. A mi directora de tesis, Francisca Hervas, por los comentarios realizados que constituyeron un gran aporte para la investigación. A Christian Andrade por hacer del laboratorio un lugar ameno y divertido.

Además quiero agradecer a mis amigas y amigos: Carla, Cristina, Jorge Andrés, Mary, Pablo que encontré a lo largo de mi carrera universitaria. A mis amigas de siempre: Karina, Paola, Yuliana y Andrea por su amistad incondicional.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE LOS EMBRIONES	17
4.2 PROCESAMIENTO Y FIJACIÓN DE LOS EMBRIONES	17
4.2.1 SOLUCIONES Y FIJATIVOS	17
4.2.2 PROCESAMIENTO DE EMBRIONES.....	19
4.2.3 FIJACIÓN DE EMBRIONES	20
4.3 OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LOS EMBRIONES	21
4.3.1 BISECCIONES.....	21
4.3.2 SECCIONES EN VIBRATOMO	21
4.3.3 TINCIÓN FLUORESCENTE PARA NÚCLEOS CELULARES Y MONTAJE DE PLACAS	22
4.4 FOTOGRAFÍA DE EMBRIONES ENTEROS, BISECCIONES, SECCIONES Y PLACAS	22
5. RESULTADOS.....	24
5.1 EL DESARROLLO TEMPRANO DE <i>H. vertebralis</i>	24
5.2 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE EMBRIONES DE <i>H. vertebralis</i>	25

5.2.1 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL EMBRIÓN EN ESTADIO DE 2 CÉLULAS (ESTADIO 2) DE <i>H. vertebralis</i>	25
5.2.2 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL EMBRIÓN EN ESTADIO DE 4 CÉLULAS (ESTADIO 3) DE <i>H. vertebralis</i>	25
5.2.3 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL EMBRIÓN EN ESTADIO DE 8 CÉLULAS (ESTADIO 4) DE <i>H. vertebralis</i>	26
5.2.4 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL EMBRIÓN EN ESTADIO DE 16 CÉLULAS (ESTADIO 5) DE <i>H. vertebralis</i>	26
5.2.5 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA BLÁSTULA DE CÉLULAS PEQUEÑAS (ESTADIO 9) DE <i>H. vertebralis</i>	27
5.2.6 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA (ESTADIO 10) DE <i>H. vertebralis</i>	28
5.2.7 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA GÁSTRULA MEDIA (ESTADIO 11) DE <i>H. vertebralis</i>	28
5.2.8 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA GÁSTRULA TARDÍA (ESTADIO 12) DE <i>H. vertebralis</i>	29
5.2.9 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA GÁSTRULA TARDÍA (ESTADIO 12.5) DE <i>H. vertebralis</i>	30
5.2.10 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA POST-GÁSTRULA (ESTADIO 13) DE <i>H. vertebralis</i>	30
5.2.11 MORFOLOGÍA EXTERNA DE LA NÉURULA (ESTADIO 13.5, 14 Y 15) DE <i>H.</i> <i>vertebralis</i>	31

5.2.12 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL ESTADIO ARCOS BRANQUIALES (ESTADIO 18.5) DE <i>H. vertebralis</i>	32
5.2.13 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL ESTADIO DE YEMA DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 19) DE <i>H. vertebralis</i>	32
5.2.14 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL ESTADIO DE DESARROLLO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 20) DE <i>H. vertebralis</i>	33
5.2.15 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL ESTADIO DE BRANQUIAS EN DESARROLLO (ESTADIO 21) DE <i>H. vertebralis</i>	33
5.2.16 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL ESTADIO A LA ECLOSIÓN (ESTADIO 25) DE <i>H. vertebralis</i>	34
6. DISCUSIÓN	35
6.1 EL DESARROLLO TEMPRANO DE <i>H. vertebralis</i>	35
6.1.1 MORFOLOGÍA DEL CLIVAJE Y BLÁSTULA DE <i>H. vertebralis</i>	35
6.1.2 MORFOLOGÍA DE LA GÁSTRULA Y PATRÓN DE GASTRULACIÓN DE <i>H.</i> <i>vertebralis</i>	37
6.1.3 MORFOLOGÍA DE LA NÉURULA DE <i>H. vertebralis</i>	42
6.1.4 MORFOLOGÍA DE LOS EMBRIONES DE <i>H. vertebralis</i> DESDE EL ESTADIO DE ARCOS BRANQUIALES (ESTADIO 18.5) HASTA LA ECLOSIÓN DEL RENACUAJO (ESTADIO 25)	43
6.2 TAMAÑO DEL HUEVO Y TIEMPO DEL DESARROLLO TEMPRANO EN DIFERENTES ESPECIES DE DENDROBÁTIDOS	45
6.3 IMPORTANCIA DE LA MODULARIDAD EN EL DESARROLLO TEMPRANO DE RANAS CON DISTINTAS ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS	47

6.4 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LOS EMBRIONES DE <i>H.</i> <i>vertebralis</i>	49
7. LITERATURA CITADA	51
8. FIGURAS	59
9. TABLAS	97
10. ANEXOS	107

LISTA DE FIGURAS

Lista de abreviaturas.....	60
Figura 1. Resumen del desarrollo temprano de <i>H. vertebralis</i>	61
Figura 2. Morfología externa del estadio de 2 células de <i>H. vertebralis</i> (estadio 2).....	63
Figura 3. Morfología externa del estadio de 4 células de <i>H. vertebralis</i> (estadio 3).....	65
Figura 4. Morfología externa del estadio de 8 células de <i>H. vertebralis</i> (estadio 4).....	67
Figura 5. Morfología externa del estadio de 16 células de <i>H. vertebralis</i> (estadio 5).....	69
Figura 6. Morfología del estadio de blástula de células pequeñas de <i>H. vertebralis</i> (estadio 9)	71
Figura 7. Morfología de la gástrula temprana de <i>H. vertebralis</i> (estadio 10).....	73
Figura 8. Morfología de la gástrula media de <i>H. vertebralis</i> (estadio 11).....	75
Figura 9. Morfología de la gástrula tardía de <i>H. vertebralis</i> (estadio 12).....	77
Figura 10. Morfología de la gástrula tardía de <i>H. vertebralis</i> (estadio 12.5).....	79
Figura 11. Morfología de la post-gástrula de <i>H. vertebralis</i> (estadio 13).....	81
Figura 12. Secciones transversales de embriones en estadio de post-gástrula de <i>H. vertebralis</i> (estadio 13).....	83
Figura 13. Morfología externa de la néurula de <i>H. vertebralis</i> (estadios 13.5, 14 y 15).....	85
Figura 14. Morfología externa del estadio de arcos branquiales de <i>H. vertebralis</i> (estadio 18.5).....	87
Figura 15. Morfología externa del estadio de yema de las branquias de <i>H. vertebralis</i> (estadio 19).....	89

Figura 16. Morfología externa en el estadio del desarrollo de las branquias de <i>H. vertebralis</i> (estadio 20).....	91
Figura 17. Morfología externa en el estadio de branquias en desarrollo de <i>H. vertebralis</i> (estadio 21).....	93
Figura 18. Morfología externa de un embrión a eclosionar de <i>H. vertebralis</i> (estadio 25).....	95

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de fotografías, magnificación y créditos	98
Tabla 2. Número de embriones por postura de <i>H. vertebralis</i>	100
Tabla 3. Estadios del desarrollo de <i>H. vertebralis</i> en relación a la tabla de desarrollo de <i>X. laevis</i> (Niewkoop y Faber, 1994) y la tabla general de anfibios de Gosner (1960).....	101
Tabla 4. Tiempos del desarrollo, en horas y minutos, de los embriones <i>H. vertebralis</i> para cada postura.....	103
Tabla 5. Edad promedio, en horas y días, de los estadios de desarrollo de <i>H. vertebralis</i> . La edad promedio fue determinada a partir de los datos de la Tabla 2.....	104
Tabla 6. Tiempos de gastrulación. En horas y minutos, de los embriones de <i>H. vertebralis</i> . El tiempo 00:00 es el inicio de la gastrulación. El tiempo de gastrulación es el tiempo que tardan los embriones desde la formación del labio dorsal del blastoporo hasta el cierre del mismo	105
Tabla 7. Modos de reproducción, diámetros de huevo y tiempos de gastrulación en varias especies de anuros. El tiempo de gastrulación es el tiempo que tardan los embriones desde la fecundación hasta el final de la gastrulación.....	106

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Diagrama de los movimientos de la gastrulación en <i>Xenopus</i>	108
Anexo 2. Movimiento de epíbole.....	109
Anexo 3. Patrones de gastrulación en anuros	110
Anexo 4. Estadio de desarrollo completo de las branquias en varios dendrobátidos.....	111

1. RESUMEN

El presente estudio describe y analiza el desarrollo embrionario de *Hyloxalus vertebralis* (Anura: Dendrobatidae). Este análisis comprende estadios desde el clivaje hasta la eclosión de los renacuajos, y enfatiza la morfología interna de la gástrula. El análisis se lo realizó en embriones enteros y secciones sagitales y transversales con tinción fluorescente para núcleos celulares. Es de interés comparar el patrón de desarrollo embrionario de esta rana con respecto a *Epipedobates machalilla* y *Xenopus laevis*.

El anuro *H. vertebralis*, endémico del Ecuador y en peligro crítico de extinción, utiliza nidos terrestres para colocar sus huevos. Esta especie deposita alrededor de 17 huevos en cada postura. Una vez que eclosionan los renacuajos, son transportados en el dorso del macho hacia una fuente de agua, en donde se completa su desarrollo acuático hasta la metamorfosis. El diámetro promedio que presentan los embriones de esta especie es de 2.6 mm. En este dendrobátido, el tiempo requerido para avanzar desde la fertilización hasta el final de la gástrula es de 3 días. El grosor de los labios del blastoporo y la formación del collar circumblastoporal sugieren retraso en los movimientos de convergencia y extensión dorsales. El arquenterón se alargó en el estadio de gástrula tardía y se infló en el estadio de post-gástrula. El notocordio no fue observado en el estadio de post-gástrula, posiblemente debido a que las secciones transversales analizadas tenían una posición muy cercana a la región caudal del embrión.

Los resultados obtenidos revelan que el patrón de desarrollo embrionario de *H. vertebralis* es semejante a *E. machalilla*. A pesar de la gran diferencia en el tamaño de los embriones de estos dendrobátidos, se sugiere que la similitud en el modo de reproducción entre ellos reduce variaciones en el patrón de desarrollo embrionario. El desarrollo embrionario de *E. machalilla* es

lento, en comparación con el rápido desarrollo embrionario de *X. laevis*. El tiempo en el que varios eventos embrionarios ocurre es diferente entre estas ranas. Se sugiere que las diferencias que presentan los dendrobátidos y *X. laevis* están relacionadas con sus distintos modos de reproducción.

Palabras clave: arquenterón, collar circumblastoporal, Dendrobatidae, *Epipedobates machalilla*, gástrula, *Hyloxalus vertebralis*, modos de reproducción, notocordio, *Xenopus laevis*.

2. ABSTRACT

This work describes and analyzes the embryonic development of *Hyloxalus vertebralis* (Anura: Dendrobatidae). The study of the embryonic development includes stages from the cleavage to the hatching of tadpoles, with an emphasis on the internal morphology of the gastrula stage. The analysis was conducted in whole embryos and sagittal and transverse sections with fluorescent staining for cell nuclei. The study includes a comparison of the pattern of embryonic development of this frog with *Epipedobates machalilla* and *Xenopus laevis*.

Hyloxalus vertebralis, an endemic frog from Ecuador, lays the eggs on terrestrial nests. This species lays about 17 eggs in each nest. Once the tadpoles hatch, they are transported in the back of the male to a source of water, where they complete their aquatic development until the end of metamorphosis. The embryos average diameter is 2.6 mm. In this dendrobatid frog, the time required from fertilization to the end of gastrulation is 3 days. The thickness of the lips of blastopore and the circumblastoporal collar suggests a delay in the dorsal converge and extension movements. The archenteron elongated during the late-gastrula stage and it inflates at the end of gastrulation. The notochord was not observed in the post-gastrula stage, possibly because the embryos were sectioned in a very close position to the caudal region of the embryo.

These results show that the pattern of the embryonic development of *H. vertebralis* is similar to *E. machalilla*. Despite the great variation in the size of the embryos of these dendrobatids, it is suggested that the similarity in the mode of reproduction between them reduces variations in the pattern of embryonic development. The embryonic development of *E. machalilla* is slow compared with the rapid development of *X. laevis* embryo. The timing of the

embryonic events varies between these frogs. It has been suggested that the differences observed between dendrobatids and *X. laevis* are associated with differences related to reproduction.

Key words: archenteron, circumblastoporal collar, Dendrobatidae, *Epipedobates machalilla*, gastrula stage, *Hyloxalus vertebralis*, modes of reproduction, notochord, *Xenopus laevis*.

3. INTRODUCCIÓN

Los anuros han sido organismos favoritos de investigación para el estudio del desarrollo embrionario (Duellman y Trueb, 1986). En 1998, Browder e Iten describieron varias ventajas de los anfibios para estudios del desarrollo embrionario, como son el gran tamaño del huevo, la facilidad de su manipulación y la gran cantidad de huevos que se pueden obtener en el laboratorio. La rana acuática *Xenopus laevis* (Pipidae) fue seleccionada como el organismo modelo para investigaciones de los fenómenos del desarrollo embrionario a nivel celular y molecular porque es posible la inducción de la ovulación, a voluntad de los científicos, mediante la administración de hormonas de la reproducción (Browder e Iten, 1998).

El desarrollo temprano en anuros ha sido estudiado en *X. laevis* (Gilbert, 2010). El huevo de los anuros presenta polaridad a lo largo del eje animal-vegetal antes de ser fertilizado, lo que se especifica en la oogénesis. Además, el oocito almacena mRNAs maternos esenciales para el desarrollo embrionario (Yasuo y Lemaire, 2001). La embriogénesis describe los estadios comprendidos entre la fertilización del huevo y la eclosión de los renacuajos (Gilbert, 2010). El ingreso del espermatozoide al huevo puede ocurrir en cualquier parte del hemisferio animal del huevo de los anfibios. El punto de entrada del espermatozoide es importante ya que determina la orientación del eje dorso-ventral. El lado ventral será definido por el punto de entrada del espermatozoide y el dorsal será el lado opuesto, por el efecto de la rotación cortical del huevo. La rotación cortical promueve la rotación del citoplasma cortical con respecto al citoplasma interno y expone una banda de citoplasma gris, llamada media luna gris. La media luna gris marca el lado dorsal del embrión, donde se iniciará el proceso de gastrulación (Gilbert, 2010).

Además, existe evidencia de que la vía de señalización canónica Wnt/ β -catenina interviene en la determinación del lado dorsal del huevo de los anuros (Heasman, 2006). La β -catenina es una proteína multifuncional que actúa como un factor de transcripción para la formación de tejidos dorsales bajo la influencia de la vía Wnt (Heasman, 2006). En embriones de *X. laevis*, la β -catenina se sintetiza originalmente en todo el embrión, a partir del mRNA materno. Una vez que se produce la rotación cortical del huevo, esta proteína se acumula en la región dorsal y se mantiene en esta zona durante el clivaje. La destrucción de la β -catenina se da por la unión a la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) conforme avanza el desarrollo. Sin embargo, en la región dorsal la β -catenina no se destruye debido a que los componentes de la vía de señalización canónica Wnt11, Dishevelled (Xdsh) y GBP inactivan a GSK3 y así protegen a la β -catenina en esta región. La β -catenina promueve la formación del centro de Nieuwkoop y de esta manera se inicia la diferenciación dorso-ventral (Gilbert, 2010).

La fecundación es seguida por el clivaje. En *X. laevis*, el clivaje se caracteriza por ser radialmente simétrico, holoblástico y sin crecimiento celular (Gilbert, 2010). Las dos primeras segmentaciones son meridionales, comienzan en el hemisferio animal y lentamente se extienden al hemisferio vegetal, mientras que la tercera división es ecuatorial. Sin embargo, la concentración de yema en el hemisferio vegetal es un impedimento para las segmentaciones, por lo que la tercera división es desplazada hacia el polo animal. Como resultado de éste clivaje desigual se establecen dos regiones: pequeños blastómeros de división rápida en el hemisferio animal y grandes blastómeros de división lenta en el hemisferio vegetal (Gilbert, 2010).

Cuando el embrión alcanza las 128 células se denomina blástula. Este estadio consiste en la formación del blastocele, cavidad ubicada al interior del hemisferio animal. El blastocele está lleno de fluido el cual ejerce presión sobre la pared del mismo. Esta cavidad se expande

conforme avanza el desarrollo y separa a las células del techo de las del piso del blastocele (Warner, 1984). El blastocele tiene dos funciones principales, impedir la interacción prematura entre las células del techo del blastocele y las de células del piso del blastocele y durante la gastrulación, permitir la migración celular del endomesodermo. Las células del techo del blastocele están destinadas a convertirse en ectodermo y las células de la región vegetal, en ausencia de inducción embrionaria están destinadas a convertirse en endodermo. La inducción embrionaria que reciben las células de la región marginal desde la región vegetal permiten que esta zona se convierta en mesodermo (Wolpert *et al.*, 2007).

El embrión de *X. laevis*, en el doceavo ciclo celular, experimenta la transición media de la blástula (TBM). En este estadio, se activa la transcripción de la mayoría de los genes cigóticos, los ciclos celulares se vuelven asíncronos y los blastómeros adquieren la capacidad de ser móviles (Newport y Kirschner, 1982). La activación o represión de ciertos genes cigóticos en la TBM es regulada a través de la desmetilación de sus promotores. Una vez que los promotores son desmetilados, los factores de transcripción maternos son capaces de unirse a los promotores y dar comienzo a la transcripción de los genes cigóticos (Stancheva *et al.*, 2002). Los genes que actúan en el desarrollo son altamente regulados, con el fin de que éstos se activen solamente en el lugar y momento precisos (Wolpert *et al.*, 2007).

El inicio de la transcripción cigótica y la ubicación diferencial de la información materna a lo largo del eje animal-vegetal juegan un papel crítico en la especificación de las capas germinales embrionarias (Yasuo y Lemaire, 2001). Las tres capas germinales son el ectodermo, el mesodermo y el endodermo. El ectodermo prospectivo se ubica en el hemisferio animal y es el tejido que dará origen al sistema nervioso y a la piel. El mesodermo prospectivo se localiza en la zona marginal, región ubicada en el ecuador de la blástula, y dará lugar a tejidos como músculo,

sangre, somitas y notocordio. El endodermo prospectivo, ubicado en el hemisferio vegetal, formará intestinos, pulmones, hígado, entre otros tejidos (Gilbert, 2010).

En *X. laevis*, la especificación del ectodermo y endodermo se produce a través de mRNAs maternos que activan a genes cigóticos (Wolpert *et al.*, 2007). La formación del ectodermo es determinada por la traducción del mRNA materno de E3 *Ubiquitin-Ligasa Ectodermin*. Este factor materno se localiza en el hemisferio animal y su función principal es limitar el efecto de las señales inductoras de mesodermo (Gilbert, 2010). El endodermo se especifica en la región vegetal gracias al factor de transcripción materno *VegT*. Este factor de transcripción activa la expresión de los genes cigóticos *Endodermin*, *IFABP*, *Xlhbox8*, entre otros, para alcanzar la diferenciación del endodermo (Dale, 1999).

En contraste, la formación del mesodermo es totalmente dependiente de señales inductoras (Wolpert *et al.*, 2007). En la inducción del mesodermo y la adquisición de su patrón dorso-ventral intervienen cuatro vías distintas de señalización molecular. La vía de inducción mesodermal primaria proviene de la región vegetal y las proteínas utilizadas como moléculas de señalización son: VegT, Activin, Derriere, Nodal (*Xenopus* Nodal-related proteins o Xnrs), entre otros miembros de la familia TGF- β . La segunda señal proviene del centro de Nieuwkoop e induce mesodermo dorsal y la formación del organizador de Spemann. El centro de Nieuwkoop se ubica en la región vegetal-dorsal del embrión (Wolpert *et al.*, 2007). Los siguientes dos tipos de señales se generan en el mesodermo inducido y establecen su patrón dorso-ventral. Las proteínas secretadas por el organizador de Spemann constituyen el tercer tipo de señalización. Estas proteínas son Noggin, Chordin, Follistatin, Cerberus, entre otras; y poseen una acción dorsalizante en el mesodermo (Wolpert *et al.*, 2007). El cuarto tipo de señalización promueve la ventralización del mesodermo y se produce cuando los genes *BMP4* y *Xwnt8* se expresan. Los

genes cigóticos mesodermales *Brachyury*, *Gooseoid* y *Eomesodermin* son los primeros en expresarse y constituyen la respuesta más temprana a la inducción mesodermal (Wolpert *et al.*, 2007; Heasman, 2006). Una vez que las tres capas germinales se han especificado se inicia la gastrulación (Anexo 1).

La gastrulación es el evento morfogénico más dramático en el desarrollo embrionario de anuros (Lawrence y Morel, 2003). Durante la gastrulación de *X. laevis*, las células empiezan a interactuar unas con otras para que las capas germinales prospectivas ocupen sus posiciones espaciales definitivas, en relación con el plan general del cuerpo del animal (Wolpert *et al.*, 2007). Durante la gastrulación, por medio de movimientos y cambios de formas celulares el ectodermo recubrirá la superficie externa del embrión y el endodermo las cavidades internas, mientras que el mesodermo se ubicará entre las dos capas (Wolpert *et al.*, 2007; Ewald *et al.*, 2004; Keller, 1996).

El proceso de gastrulación se inicia en el borde vegetal-dorsal de la zona marginal de involución (IMZ, por sus siglas en inglés). Las células ubicadas en esta zona cambian de forma drásticamente y adquieren una forma de botella (Gilbert, 2010; Wolpert *et al.*, 2007). Las células de botella prospectivas se constriñen activamente en la superficie apical y se alargan en el eje apical-basal, lo que resulta en la curvatura de la IMZ y la formación de una invaginación superficial. La invaginación de las células de botella forma una depresión local, la hendidura blastoporal (Keller *et al.*, 2003).

Al mismo tiempo que las células de botella se forman externamente, al interior del embrión se produce la rotación vegetal de las células endodermales (Winklbauer y Schürfeld, 1999). Los movimientos masivos de endodermo vegetal empujan dorsalmente a las células del piso del blastocele y las posicionan entre el techo del blastocele y el ectodermo. Las células del

piso del blastocele corresponden a endodermo faríngeo prospectivo. Este tejido empieza a migrar hacia el hemisferio animal a lo largo de la superficie basal del techo del blastocele, dirigido por la rotación vegetal. La primera porción de la IMZ es halada hacia el interior del embrión pasivamente y corresponde a mesodermo precordial prospectivo (Stern, 2004). Este mesodermo prospectivo junto al endodermo faríngeo prospectivo son conocidos colectivamente como endomesodermo (Gilbert, 2010). La aposición del endomesodermo sobre el ectodermo genera un surco entre estas dos capas conocido como el cleft de Brachet (Keller *et al.*, 2003). Este surco es muy importante ya que impide la interacción entre el endomesodermo y el ectodermo (Gorny y Steinbeisser, 2012).

Una vez iniciada la involución, existe un movimiento celular continuo hacia el interior del embrión y las células que conforman el labio del blastoporo cambian constantemente (Gilbert, 2010). El orden en el que los tejidos prospectivos ingresan al embrión es determinado por la rotación vegetal (Winklbauer y Schürfeld, 1999). Las células de botella junto al mesodermo precordial prospectivo, precursor de la cabeza; son los primeros tejidos en componer el labio dorsal del blastoporo. El siguiente tejido que involuciona es el cordamesodermo prospectivo, precursor del notocordio (Gilbert, 2010). La involución de las células de botella por el labio dorsal del blastoporo inicia la formación del arquenterón, cavidad que derivará en el futuro intestino. El agrandamiento del arquenterón desplaza al blastocele hacia el lado ventral del embrión (Wolpert *et al.*, 2007). Son varias las fuerzas que intervienen en el alargamiento del arquenterón, entre ellas la rotación vegetal y la epíbole (Ewald *et al.*, 2004).

El movimiento de epíbole es un evento que se produce simultáneamente con la involución. La epíbole produce la expansión del ectodermo para cubrir a todo el embrión (Gilbert, 2010). La intercalación radial de las células profundas del ectodermo es un mecanismo

que promueve el movimiento de epíbole. El objetivo de la intercalación radial es reducir el número de capas celulares, con el fin de obtener dos capas de ectodermo en el estadio de gástrula media (Keller, 1980). Una vez que se redujo el número de capas celulares ectodérmicas, las fibrillas de fibronectina dirigen la migración celular del ectodermo para cubrir a todo el embrión. Las fibrillas de fibronectina son parte de la matriz extracelular ubicada en la superficie interna del techo del blastocele (Marsden y DeSimone, 2001). Tanto la epíbole como la involución empiezan al inicio de la gastrulación y se completan al final de ésta (Myers *et al.*, 2002).

A medida que avanza el proceso de gastrulación, el labio dorsal del blastoporo se expande lateral y ventralmente para formar un anillo que rodea a células endodermales. Este parche remanente de endodermo se denomina tapón de yema, el mismo que eventualmente se internaliza (Gilbert, 2010; Wolpert *et al.*, 2007). En el estadio de gástrula media de *X. laevis*, las células que ingresan por el labio del blastoporo empiezan a estrecharse en el eje medio-lateral y se alargan en el eje antero-posterior, eventos conocidos como convergencia y extensión dorsales (Stern, 2004). Las células de mesodermo presuntivo de la cabeza ya han ingresado al embrión para entonces, por lo que estas no sufren convergencia y extensión dorsales (Gilbert, 2010). Los movimientos de convergencia y extensión dorsales alargan al embrión en el eje antero-posterior y promueven el alargamiento del notorcordio (Shook *et al.*, 2004). Una de las moléculas responsables del control de la convergencia y extensión dorsales y el cierre del blastoporo en *X. laevis* es Dishevelled (Ewald *et al.*, 2004).

En *X. laevis*, la convergencia y extensión dorsales se dan primero en la región dorsal y más tarde en las regiones laterales. En la región ventral ocurre “engrosamiento convergente”. La convergencia en la zona marginal ventral ayuda a que el lado ventral del blastoporo se cierre, pero al no existir extensión esta zona se engrosa para formar un collar de mesodermo presuntivo.

Este collar permanece en el labio del blastoporo hasta el final de la gastrulación para posteriormente adicionar este tejido al eje dorsal (Elinson y del Pino, 2012).

Al final de la gastrulación, el blastoporo está cerrado y se inicia la neurulación, fase que consiste en la formación del tubo neural (Wolpert *et al.*, 2007). En *X. laevis*, las señales morfológicas que nos indican que la neurulación ha comenzado es la formación de la placa neural seguida por el levantamiento de los pliegues neurales. Estos pliegues se originan en los extremos de la placa neural, ubicada en la región dorsal del ectodermo. Durante el proceso de neurulación la placa neural se alarga en el eje rostro-caudal y los pliegues neurales se elevan y se acercan entre sí hasta formar el tubo neural (Gilbert, 2010). La región neural anterior formará el cerebro, mientras que la posterior la medula espinal. Una vez que todos los órganos se hayan formado, en la fase conocida como organogénesis, el renacuajo no depende más de la yema y empieza a nadar y comer (Gilbert, 2010).

A pesar de que el patrón de desarrollo embrionario para anuros se ha descrito en base al organismo modelo *X. laevis*, esta rana no representa el modelo general de desarrollo de los anuros. De hecho, los anuros muestran un sinnúmero de variaciones en su desarrollo y modo reproductivo debido al largo tiempo en el que han evolucionado (Elinson y del Pino, 2012). Duellman y Trueb (1986) proponen tres categorías de modos reproductivos de anuros en base al hábitat: huevos acuáticos, huevos en nidos terrestres y huevos en nidos de espuma. Las adaptaciones reproductivas están asociadas a cambios en la velocidad del desarrollo temprano y ocurrencia de los eventos del desarrollo. Entre las variaciones producidas en el desarrollo que se han estudiado encontramos el tiempo requerido para finalizar la gastrulación, la ocurrencia de los procesos morfogenéticos en la gastrulación y la diferencia temporal de la formación del organizador (Elinson y del Pino, 2012).

A continuación se detallan diversos modos de reproducción en anuros, con el propósito de exponer la diversidad existente. Podemos mencionar a *X. laevis*, rana que tiene hábito acuático y se caracteriza por la producción de cientos de huevos en cada ovulación, con un tamaño aproximado de 1.2 mm de diámetro cada uno (Duellman y Trueb, 1986). El modo reproductivo observado en *Engystomops randi* (Leptodactylidae) consiste en la construcción de nidos de espuma. En promedio los nidos de esta rana contienen 110 huevos con un diámetro aproximado de 1.1 mm cada uno (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Otro ejemplo, es el modo reproductivo de *Epipedobates machalilla* (Dendrobatidae). Esta rana deposita los huevos en ambientes terrestres y cada nido contiene alrededor de 15 embriones (Coloma, 1995). El tamaño de los huevos de esta especie es de 1.6 mm de diámetro (del Pino *et al.*, 2004). Uno de los modos reproductivos más divergentes es el de la rana marsupial *Gastrotheca riobambae* (Hemiphractidae). La hembra tiene una bolsa de integumento localizada en su espalda, la misma que le sirve para incubar alrededor de 128 huevos hasta que alcancen el estadio de renacuajos avanzados. Los embriones poseen un diámetro aproximado de 3 mm (del Pino y Escobar, 1981).

En el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador se realizan estudios comparativos del desarrollo embrionario en ranas ecuatorianas con distintos modos de reproducción, velocidad del desarrollo y tamaño del huevo (del Pino *et al.*, 2007; Moya *et al.*, 2007). La comparación del desarrollo temprano de estas ranas permitió reconocer variación en el tiempo requerido para avanzar desde la fecundación hasta el final de la gastrulación. *Xenopus laevis* y las ranas del género *Engystomops* tardan 14 y 24 horas, respectivamente, para finalizar la gastrulación (Romero-Carvajal *et al.*, 2009; Niewkoop y Faber, 1994). En contraste, la rana dendrobátida *E. machalilla* y la rana marsupial *G. riobambae* se desarrollan más lento y requieren 4 y 14 días, respectivamente, para completar el mismo proceso

(del Pino *et al.*, 2004; del Pino y Elinson, 1983). Las diferencias en el tiempo requerido para finalizar la gastrulación pueden estar relacionadas con modificaciones en los patrones de gastrulación (Elinson y del Pino, 2012).

Distintos patrones de gastrulación en dichas ranas se determinaron en base al análisis y comparaciones realizadas. Estos patrones de gastrulación posiblemente estén relacionados con las estrategias de desarrollo y la filogenia de anuros (Elinson y del Pino, 2012; Venegas-Ferrín *et al.*, 2010; Moya *et al.*, 2007; del Pino *et al.*, 2007). En los embriones de desarrollo rápido, *X. laevis* y ranas túngara (*Engystomops*), se ha observado que la elongación del arquenterón ocurre desde el inicio de la gastrulación, simultáneamente con la involución. En contraste, en las ranas de desarrollo lento como *E. machalilla* y *G. riobambae* tan solo la involución se produce durante la gastrulación. La elongación del arquenterón en *E. machalilla* ocurre durante la gástrula media, mientras que en *G. riobambae* este es un evento post gastrulación (Elinson y del Pino, 2012; del Pino *et al.*, 2007; del Pino *et al.*, 2004). Los movimientos de convergencia y extensión dorsales fueron detectados por la expresión de las proteínas Brachyury y Lhx1 en el notocordio (Venegas-Ferrín *et al.*, 2010). En los embriones de *X. laevis* y ranas túngara, se observó que la convergencia y extensión dorsales, que promueven el alargamiento del notocordio, se inician en la gástrula media (Elinson y del Pino, 2012; del Pino *et al.*, 2007). En las ranas *E. machalilla* y *G. riobambae* la elongación del notocordio y la convergencia y extensión dorsales están retrasados hasta la post gástrula, después del cerramiento del blastoporo (Moya *et al.*, 2007; Benítez y del Pino, 2002).

La proteína Lhx1 además de expresarse en el notocordio, se la encuentra en la placa precordial por lo que permite determinar otro evento que varía en el desarrollo de anuros, que corresponde a diferencias temporales en el organizador (Elinson y del Pino, 2012; Venegas-

Ferrín *et al.*, 2010; Moya *et al.*, 2007). El organizador de los embriones de anfibios se desarrolla a partir del labio dorsal del blastoporo y, de acuerdo a sus propiedades inductivas, está dividido en cabeza, tronco y cola. Los organizadores de la cabeza y del tronco están representados por la placa precordial y el notocordio, respectivamente (De Robertis, 2006). La expresión de *Lhx1* reveló la presencia simultánea de ambos organizadores en el estadio de gástrula media en las ranas de desarrollo rápido *X. laevis* y *E. randi*. Por el contrario, existió separación temporal de los organizadores de la cabeza y del tronco en embriones de *E. machalilla*. El organizador de la cabeza se desarrolló en la gastrulación, mientras que el organizador del tronco fue detectado post-gástrula, después del cierre del blastoporo (Venegas-Ferrín *et al.*, 2010). En la rana de desarrollo lento *G. riobambae* no pudo ser claramente detectada la placa precordial. Sin embargo, la expresión de *Lhx1* en el notocordio fue observada después del cierre del blastoporo (Venegas-Ferrín *et al.*, 2010). La demora en el alargamiento del notocordio en *E. machalilla* y *G. riobambae* posiblemente ocurre porque el endomesodermo del tronco permanece en el collar circumblastoporal (CBC, por sus siglas en inglés) hasta el final de la gastrulación (Elinson y del Pino, 2012).

La acumulación de las células que involucran por el labio del blastoporo durante la gastrulación provocan la formación del collar circumblastoporal. El anuro *G. riobambae* presenta uno de los modos más divergentes de gastrulación en los anfibios. Cuando el blastoporo está cerrado, el gran CBC constituirá el disco embriónico, a partir del cual se deriva el cuerpo del embrión (Moya *et al.*, 2007). La presencia del disco embriónico se asemeja a lo que ocurre en el desarrollo del pollo, sin embargo no son estructuras homólogas. En el dendrobátido *E. machalilla*, también existe un CBC conspicuo, pero no hay formación del disco embriónico (del Pino *et al.*, 2007). En los embriones de desarrollo rápido de *E. randi* el CBC es menos

pronunciado y tampoco se forma el disco embriónico (Moya *et al.*, 2007).

La familia Dendrobatidae posee 298 especies con una distribución restringida al centro y sur de América (Duellman y Trueb, 1986). Los dendrobátidos presentan actividad diurna y distintos comportamientos reproductivos (Grant *et al.*, 2006; del Pino *et al.*, 2004). Sin embargo, la mayoría de individuos de esta familia presentan nidos terrestres y cuidado parental (Elinson y del Pino, 2012). El objeto de estudio de esta disertación es el desarrollo de la rana *Hyloxalus vertebralis* (Dendrobatidae), también conocida como rana cohete de Cuenca (Coloma *et al.*, 2013).

Hyloxalus vertebralis es endémico del Ecuador y se encuentra en peligro crítico de extinción. Este anuro se distribuye en los valles interandinos y en las estribaciones sur-occidentales y centro-orientales de los Andes del Ecuador a elevaciones comprendidas entre los 1,770-3,500 metros sobre el nivel del mar (Coloma *et al.*, 2013). Los huevos son colocados en nidos terrestres, para luego ser transportados en el dorso del macho hacia una fuente de agua en donde se completa su desarrollo acuático hasta la metamorfosis (Coloma *et al.*, 2013). Se ha reportado que la hembra deposita alrededor de 5 a 12 huevos, con un diámetro aproximado de 3 mm (Coloma, 1995).

El objetivo de este estudio es la realización de una tabla del desarrollo y la descripción de la morfología externa e interna del desarrollo embrionario temprano de *H. vertebralis* para posteriormente comparar los resultados obtenidos con otros dendrobátidos y la rana modelo *X. laevis*. Además, se complementará la información obtenida en estudios previos sobre el desarrollo embrionario de esta especie. De esta manera se aportará mayor información para futuros estudios de este anuro, siendo estos datos de interés científico, los mismos que pueden ser utilizados para la conservación de esta especie.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE LOS EMBRIONES

Los embriones de *Hyloxalus vertebralis* fueron donados por el Centro de Investigación y Conservación de Anfibios (CICA) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Los especímenes de esta especie fueron colectados en Sevilla de Oro, en la provincia del Azuay. Las colecciones fueron permitidas bajo la autorización 016-IC-FAU-DNBAP-MA del Ministerio del Ambiente.

En el Laboratorio de Biología del Desarrollo, las posturas fueron trasladadas a cámaras húmedas para evitar desecación. Las cámaras húmedas son cajas Petri pequeñas de cristal con una cama de papel absorbente empapado en agua destilada. Cada caja fue rotulada con datos que ayuden a identificar a los embriones. Estos datos son fecha, número de postura, el estadio y la cantidad de huevos.

4.2 PROCESAMIENTO Y FIJACIÓN DE LOS EMBRIONES

4.2.1 SOLUCIONES Y FIJATIVOS

4.2.1 SOLUCIÓN DE STEINBERG

- 58 mM NaCl
- 0.65 mM KCl
- 0.85 mM MgSO₄

- 5 mM Tris, pH8
- 0.34 mM Ca (NO₃)₂
- Agua destilada

4.2.1.2 SOLUCIÓN SALINA TAMPÓN FOSFATO (PBS)

- 1.5 mM KH₂PO₄
- 7 mM Na₂HPO₄
- 137.7 mM NaCl

4.2.1.3 FORMALINA 10%

- 100 ml formaldehído (37%)
- 900 ml agua destilada

4.2.1.3 FIJATIVO SMITH

4.2.1.4.1 SOLUCIÓN A

- 10 g K₂Cr₂O₇ en 1 L de agua destilada

4.2.1.4.2 SOLUCIÓN B

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

El fijativo Smith se prepara inmediatamente antes de usar, en una proporción 1:1 de las soluciones A y B.

4.2.1.5 GELATINA 7.5%

- 1.5 g gelatina sin sabor
- 20 ml PBS 1x

4.2.1.6 AGAROSA 6%

- 1.2 g agarosa (100%)
- 20 ml PBS 1x

4.2.2 PROCESAMIENTO DE EMBRIONES

Los embriones obtenidos fueron manipulados y observados en solución de Steinberg al 15% (4.2.1.1). Para las observaciones, se utilizó un estereomicroscopio WILD (Heerbrugg) y lámparas de fibra óptica KL 1500 (Zeiss). El diámetro de los embriones fue determinado a través del procesador de imágenes Axiovision 4.6.3.

Los estadios de los embriones de *H. vertebralis* se establecieron a partir de la comparación de su desarrollo externo con la tabla del desarrollo descrita para *E. machalilla* (del Pino *et al.*, 2004)

Embriones de todos los estadios del desarrollo fueron fijados para su futura manipulación, observación y documentación. Todas las observaciones fueron realizadas a temperatura ambiente, dentro del laboratorio.

4.2.3 FIJACIÓN DE EMBRIONES

Previo a la fijación, se retiró las capas de gelatina de los embriones de *H. vertebralis* con la ayuda de pinzas de relojero. Este es un proceso delicado que se llevó a cabo bajo un estereoscopio WILD (Heerbrugg) e iluminación con lámparas de fibra óptica KL 1500 (Zeiss). Luego del proceso de fijado, los embriones fueron almacenados en tubos Eppendorf con un número de registro, la fecha y hora de fijación, estadio, y cantidad de embriones fijados.

4.2.3.1 FIJACIÓN CON SMITH

Los embriones sin gelatina, fueron incubados durante 24 horas en el fijativo de Smith (4.2.1.4). Los embriones junto con el fijativo permanecieron en frascos oscuros, a temperatura ambiente. Al día siguiente, se realizaron varios lavados a los embriones con agua destilada, hasta eliminar el exceso de fijativo. Finalmente, los embriones fueron almacenados a 4 °C en una solución de 600 µl de Formalina 10% (4.2.1.3) y 900 µl de PBS 1X (4.2.1.2), hasta ser requeridos.

4.3 OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA INTERNA DE LOS EMBRIONES

4.3.1 BISECCIONES

Embriones en los estadios deseados, previamente fijados en solución de Smith (4.1.1.4), fueron embebidos en glicerol y seccionados en su parte media usando un bisturí. Cada una de las mitades fue conservada a 4° C en una solución 2:3 de Formalina 10% (4.2.1.3) y PBS 1X (4.2.1.2), hasta ser requeridas.

4.3.2 SECCIONES EN VIBRATOMO

Embriones enteros y las bisecciones de los embriones del dendrobátido *H. vertebralis*, fueron embebidos en una solución de gelatina al 7.5% (4.2.1.5) e incubados a 45° C durante cuatro horas, hasta que la gelatina se infiltre en el embrión. Posteriormente, los embriones fueron transferidos a una solución caliente de agarosa al 6 % (4.2.1.6). Una vez solidificada la agarosa, se procedió a cortar un cubo de agarosa que contenía al embrión. El cubo de agarosa fue adherido a un porta-tejido, con ayuda de pegamento instantáneo. El porta-tejido fue asegurado en la plataforma del Vibratomo marca Oxford. El contenedor del Vibratomo se llenó con 600 ml de agua destilada, con el fin de facilitar la recolección de las secciones. Se realizaron secciones de 50 µm de grosor, utilizando una hoja de gillette, a una velocidad de 2.5, amplitud de 6 y 25° de inclinación. Las secciones obtenidas fueron transferidas y almacenadas en una mezcla 2:3 de

Formalina 10 % (4.2.1.3) y PBS 1X (4.2.1.2), a 4 °C hasta su posterior estudio y registro fotográfico.

4.3.3 TINCIÓN FLUORESCENTE PARA NÚCLEOS CELULARES Y MONTAJE DE PLACAS

El tinte fluorescente Hoechst 33258 fue utilizado para detectar núcleos celulares en las secciones de Vibratomo. El tinte Hoechst 33258 se intercala con la doble hélice de ADN, haciendo posible la observación de núcleos celulares bajo iluminación fluorescente. Las secciones previamente lavadas con PBS 1X (4.2.1.2), fueron incubadas por 20 minutos en la solución de 1 µl de Hoechst 33258 en 1 ml de PBS 1X (4.2.1.2). La incubación se realizó a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Luego, las secciones fueron lavadas con PBS 1X (4.2.1.2) cada 10 minutos, por cinco ocasiones y se almacenaron en glicerol. Para el montaje de las secciones en placas, las secciones teñidas fueron transportadas a un portaobjetos de cristal con una gota de glicerol, y finalmente se colocó un cubreobjetos. Las placas fueron conservadas a -20° C hasta el momento de su análisis.

4.4 FOTOGRAFÍA DE EMBRIONES ENTEROS, BISECCIONES, SECCIONES Y PLACAS

Embriones enteros, bisecciones y secciones sin tinción de núcleos fueron fotografiados utilizando un estéreo-microscopio Stemi SV6, de Carl Zeiss. Las imágenes fueron tomadas utilizando luz directa. Las placas con la tinción fluorescente de núcleos fueron fotografiadas

utilizando un microscopio AxioObserver.Z1, de Carl Zeiss. Se utilizó microscopia de fluorescencia para estas fotografías. Todas las imágenes fueron tomadas con una cámara AxioCam y fue utilizado el programa de procesamiento de imágenes AxioVision 4.6.3. Las imágenes digitales fueron editadas usando el programa Adobe Photoshop CS6. La tabla 1 expone datos importantes de las fotografías utilizadas en el presente estudio.

5. RESULTADOS

5.1 EL DESARROLLO TEMPRANO DE *H. vertebralis*

El diámetro promedio que presentan los embriones de *Hyloxalus vertebralis* es de 2.6 mm. Los huevos de *H. vertebralis* presentan pigmentación marrón, la misma que decrece a lo largo del eje animal-vegetal. Además, se observó que esta especie coloca en promedio 17 huevos en cada postura (Tabla 2).

El desarrollo temprano de *H. vertebralis* fue dividido en 25 estadios, desde la fertilización hasta antes de la eclosión (Tabla 3). La tabla de desarrollo de esta especie fue elaborada en base a la realizada en *E. machalilla* (del Pino *et al.*, 2004). El resumen del desarrollo temprano de *H. vertebralis* se muestra en la Figura 1. Después de la fertilización de los huevos, los embriones atravesaron las etapas de clivaje (Fig. 1A-C), blástula (Fig. 1D), gastrulación (Fig. 1E-I), neurulación (Fig. 1J-L) y morfogénesis, hasta tomar la forma de renacuajos (Fig. 1M-P).

La Tabla 4 muestra la edad promedio de los embriones de *H. vertebralis*. La edad es el tiempo, en horas y días, que tardó un embrión en desarrollarse desde el estadio de dos células hasta un estadio determinado. La duración de un estadio fue obtenida al restar los tiempos de desarrollo de dos estadios adyacentes. La edad promedio fue estimada a partir de las duraciones promedio. A temperatura ambiente (18° a 22° C), dentro del laboratorio, los embriones de *H. vertebralis* tardaron 18 días aproximadamente en desarrollarse, desde el estadio de dos células hasta la eclosión del renacuajo (Tabla 5). El tiempo que tarda esta especie desde la formación

5.2 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE EMBRIONES DE *H. vertebralis*

La morfología externa de los embriones de esta especie fue estudiada mediante microfotografías, utilizando luz directa. El estudio de la morfología interna de la blástula y gástrula de embriones de *H. vertebralis* se lo realizó por medio de secciones transversales y sagitales. Además, se procedió a realizar tinciones fluorescentes para núcleos con la finalidad de observar la disposición celular.

5.2.1 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL EMBRIÓN EN ESTADIO DE 2 CÉLULAS (ESTADIO 2) DE *H. vertebralis*

La figura 2A es un esquema de la vista externa de un embrión de estadio 2. La primera división celular se produjo durante este estadio. El sitio donde se originó el primer surco del clivaje fue en el hemisferio animal. El hemisferio animal se diferenció del hemisferio vegetal debido a la pigmentación marrón oscura que presenta (Fig. 2B). La forma que presenta el embrión en las figuras 2B y 2C es un artefacto de la fijación.

Gradualmente, el surco del clivaje avanzó hasta el hemisferio vegetal (Fig. 2D). El plano de la primera división celular fue en el eje animal-vegetal del embrión. Al final de este estadio se observó un embrión con dos células de igual tamaño.

5.2.2 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL EMBRIÓN EN ESTADIO DE 4 CÉLULAS (ESTADIO 3) DE *H. vertebralis*

La figura 3A es un esquema de la vista animal externa de un embrión de estadio 3. La segunda división celular se produjo durante este estadio y tardó aproximadamente 1 hora (Tabla 2). El sitio donde se originó el segundo surco del clivaje fue en el hemisferio animal (Fig. 3B), perpendicular a la primera división celular (Fig. 3C). Gradualmente, el surco del clivaje avanzó hasta el hemisferio vegetal. La formación del surco del segundo clivaje empezó después de que la primera división celular se completó (Fig. 3D). Al final de este estadio se observó un embrión con cuatro células o blastómeros de igual tamaño.

5.2.3 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL EMBRIÓN EN ESTADIO DE 8 CÉLULAS (ESTADIO 4) DE *H. vertebralis*

La figura 4A es un esquema de la vista animal externa de un embrión de estadio 4. La tercera división celular se produjo en un plano perpendicular al eje animal-vegetal. El surco del tercer clivaje fue desplazado hacia el hemisferio animal, dividiendo de forma desigual a los blastómeros (Fig. 4B). Como producto de la tercera división celular, se formaron cuatro micrómeros en el hemisferio animal (Fig. 4C) y cuatro macrómeros en el hemisferio vegetal (Fig. 4D). La formación del surco del tercer clivaje empezó después de que la segunda división celular se completó. El tercer evento de clivaje tardó 1 hora y 30 minutos (Tabla 2).

5.2.4 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL EMBRIÓN EN ESTADIO DE 16 CÉLULAS (ESTADIO 5) DE *H. vertebralis*

La figura 5A es un esquema de la vista animal externa de un embrión de estadio 5. La cuarta división celular que se produjo en el estadio 5 fue asimétrica, por lo que no se pudo distinguir el plano del clivaje. Se observan células pequeñas en el hemisferio animal y células grandes en el hemisferio vegetal (Fig. 5B). En el cuarto evento de división se formaron 8 micrómeros en el hemisferio animal (Fig. 5C) y 8 macrómeros en el hemisferio vegetal (Fig. 5D). El cuarto evento de clivaje tardó 1 hora y 30 minutos (Tabla 2).

5.2.5 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA BLÁSTULA DE CÉLULAS PEQUEÑAS (ESTADIO 9) DE *H. vertebralis*

La figura 6A es un esquema de la vista lateral externa de un embrión de estadio 9. Los micrómeros del hemisferio animal presentaron tamaño reducido y pigmentación, mientras que los macrómeros del hemisferio vegetal son de mayor tamaño y sin pigmentación marrón oscura. En la zona ecuatorial se observan células de tamaño intermedio y con poco pigmento (Fig. 6B). El orificio que se observa en el hemisferio animal es un artefacto de la fijación (Fig. 6C).

Secciones, en el plano animal-vegetal, mostraron una cavidad extendida en el hemisferio animal, el blastocele. Algunas células del techo del blastocele y de la zona ecuatorial presentaron pigmentación nuclear. Además, las células del techo del blastocele y de la zona ecuatorial están compactadas unas con otras; a diferencia de las células de yema, sin pigmentación nuclear y sin compactación celular (Fig. 6D).

5.2.6 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA GÁSTRULA TEMPRANA (ESTADIO 10) DE *H. vertebralis*

La figura 7A es un esquema de la vista vegetal externa de un embrión de estadio 10. En la región sub-ecuatorial, al exterior del embrión, se observó al labio dorsal del blastoporo. La forma que mostró el labio dorsal del blastoporo fue de una hendidura curva (Fig. 7B). En la sección sagital (Fig. 7C) se observó al blastocele expandido en todo el hemisferio animal, con mayor extensión que en el estadio 8. El labio dorsal del blastoporo, ubicado en región dorsal-vegetal, presentó pigmentación. Algunas células del techo del blastocele y de la zona ecuatorial presentaron pigmentación nuclear. Las células animales y aquellas que se ubican en la zona ecuatorial son de menor tamaño y presentan mayor compactación que las células vegetales (Fig. 7D). La figura 7E corresponde a un acercamiento del techo del blastocele. Se observó que el techo del blastocele está conformado por tres capas de células. En un acercamiento al labio dorsal del blastoporo se observaron varias células de botella, caracterizadas por presentar constricción en su superficie apical (Fig. 7F).

El tiempo que tarda *H. vertebralis* desde la formación del labio dorsal del blastoporo (estadio 10) hasta el cierre del mismo (estadio 13) es de aproximadamente 1.6 días (Tabla 6).

5.2.7 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA GÁSTRULA MEDIA (ESTADIO 11) DE *H. vertebralis*

La figura 8A es un esquema de la vista vegetal externa de un embrión de estadio 11. Al exterior del embrión, en estadio de gástrula media, se observó la expansión del labio dorsal del blastoporo hacia la región ventral. Como producto de esta expansión se formó el tapón de yema. (Fig. 8B). En la sección sagital (Fig. 8C) no se logró observar el tamaño del blastocele, debido al colapso del techo del mismo. El labio dorsal del blastoporo presentó pigmentación y su longitud fue mayor que en el estadio anterior. La pigmentación del labio dorsal es indicativo del ingreso de células pigmentadas, debido a los movimientos de involución. En la región dorsal-vegetal se observó una nueva cavidad interna, el arquenterón. El labio ventral del blastoporo presenta una menor longitud que el labio dorsal. La figura 8D corresponde a una sección sagital con tinción fluorescente para núcleos. En esta sección se pudo observar al cleft de Brachet en la zona dorsal y ventral.

5.2.8 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA GÁSTRULA TARDÍA (ESTADIO 12) DE *H. vertebralis*

La figura 9A es un esquema de la vista vegetal externa de un embrión de estadio 12. Al exterior del embrión, en el estadio de gástrula tardía, el tapón de yema mostró un diámetro menor al observado en el estadio 11 (Fig. 9B). En la sección sagital (Fig. 9C) se observó al blastocele con tamaño reducido, mientras que el arquenterón se observa más grande. El labio ventral del blastoporo muestra pigmentación, indicio de la involución de células pigmentadas por esta zona, al igual que por el labio dorsal. La figura 9D corresponde a una sección sagital con tinción fluorescente para núcleos. En esta sección se pudo observar al cleft de Brachet en la zona dorsal y ventral. En un acercamiento al techo del blastocele se observó la reducción en el número de

capas celulares que lo conforman. El techo del blastocele en este estadio está formado por dos capas de células (Fig. 9E).

5.2.9 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA GÁSTRULA TARDÍA (ESTADIO 12.5) DE *H. vertebralis*

La figura 10A es un esquema de la vista posterior externa de un embrión de estadio 12.5. En este estadio, se observó al tapón de yema ocupando una mínima parte de la superficie externa del embrión (Fig. 10B). En la sección sagital (Fig. 10C) se observó al blastocele con tamaño reducido, debido a la invasión de las células vegetales en el techo del blastocele. Se observó al arquenterón con mayor longitud, en comparación al estadio anterior. La figura 10D corresponde a una sección sagital con tinción fluorescente para núcleos. Aun se observa el cleft de Brachet en la zona dorsal y ventral. En un acercamiento al techo del blastocele se observó la reducción en el número de capas celulares que lo conforman. El techo del blastocele en este estadio está formado por una capa de células (Fig. 10E).

5.2.10 MORFOLOGÍA EXTERNA E INTERNA DE LA POST-GÁSTRULA (ESTADIO 13) DE *H. vertebralis*

La figura 11A es un esquema de la vista posterior externa de un embrión de estadio 13. Al exterior del embrión, en estadio de post-gástrula, se observó el cierre del blastoporo. El blastoporo se mostró alargado, en forma de cerradura. El tapón de yema ha ingresado al interior del embrión (Fig. 11B). En la sección sagital (Fig. 11C) se observó al arquenterón en su máxima

expansión. Además, se observó una acumulación de células, tras la fusión de los labios del blastoporo. Esta acumulación de células lleva el nombre de collar circumblastoporal. El blastocele ha desaparecido por completo. La figura 11D corresponde a una sección sagital con tinción fluorescente para núcleos. En esta sección se pudo observar al Cleft de Brachet en la región dorsal del embrión. En una porción del techo del arquenterón se observó al Cleft de Brachet separando a lo que posiblemente sea el ectodermo y el endomesodermo (Fig. 11E).

La figura 12A es un esquema de la vista posterior externa de un embrión de estadio 13. En la sección transversal caudal (Fig. 12B) se observó al collar circumblastoporal. No se logró observar al notocordio posiblemente porque las secciones analizadas tenían una posición muy cercana a la región caudal del embrión. La figura 12C corresponde a una sección transversal con tinción fluorescente para núcleos. En esta sección se pudo observar al collar circumblastoporal compuesto por un gran número de células pequeñas, en comparación con las células vegetales.

5.2.11 MORFOLOGÍA EXTERNA DE LA NÉURULA (ESTADIO 13.5, 14 Y 15) DE

H. vertebralis

La figura 13A es un esquema de la vista dorsal externa de un embrión de estadio 13.5. En la néurula temprana, estadio 13 avanzado, se observó a la placa neural en la región dorsal del embrión. La placa neural se observa más ancha en la región rostral que en la zona caudal. Además, se determinó que el blastoporo aún está presente en este estadio, en la región más caudal (Fig. 13D).

La figura 13B es un esquema de la vista dorsal externa de un embrión de estadio 14. En la néurula temprana, estadio 14, se observó a la placa neural en la región dorsal del embrión. En

los bordes laterales de la placa neural se observaron a los pliegues neurales elevados. Los pliegues fueron más prominentes en la región rostral. Además, se determinó que el blastoporo aún está presente en este estadio, en la región más caudal (Fig. 13E).

La figura 13C es un esquema de la vista dorsal externa de un embrión de estadio 15. En la néurula media, estadio 15, se observó el acercamiento de los pliegues neurales en la línea media del cuerpo del embrión. Como resultado de este acercamiento, el surco neural se formó en la parte media de la placa neural (Fig. 13F).

5.2.12 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL ESTADIO ARCOS BRANQUIALES (ESTADIO 18.5) DE *H. vertebralis*

La figura 14A es un esquema lateral externo de un embrión de estadio 18.5. En el estadio de arcos branquiales, se observó al arco mandibular y al arco hioideo. El arco mandibular se encontró en la región más anterior de la cabeza, seguido por el arco hioideo y el arco branquial. El embrión presenta una forma curva (Fig. 14B). Se pudo distinguir a los pronefros detrás de la región cefálica (Fig. 14C).

5.2.13 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL ESTADIO DE YEMA DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 19) DE *H. vertebralis*

La figura 15A es un esquema lateral externo de un embrión de estadio 19. La figura 15B corresponde a un esquema que muestra las ramificaciones de las branquias. En el estadio de yema de las branquias, se observó a las vesículas ópticas y al estomodeo, que dará origen a la

boca (Fig. 15C). La yema del primer par de branquias se dividió en tres pequeñas ramificaciones. La yema del segundo par de branquias fue visible. Se pudo distinguir a los pronefros detrás de la región cefálica. Además, se observó la aleta caudal (Fig. 15D).

5.2.14 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL ESTADIO DE DESARROLLO DE LAS BRANQUIAS (ESTADIO 20) DE *H. vertebralis*

La figura 16A es un esquema lateral externo de un embrión de estadio 20. La figura 16B corresponde a un esquema que muestra las ramificaciones de las branquias. En el acercamiento de la cabeza del embrión en estadio de desarrollo de las branquias, se observó a las vesículas ópticas y al estomodeo (Fig. 16C). Además, se observó a la rama anterior de las branquias con tres ramificaciones alargadas. La rama posterior de las branquias mostró mayor longitud que en el estadio anterior (Fig. 16D). La circulación de sangre en las branquias fue observada por primera vez en este estadio.

5.2.15 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL ESTADIO DE BRANQUIAS EN DESARROLLO (ESTADIO 21) DE *H. vertebralis*

La figura 17A es un esquema lateral externo de un embrión de estadio 22. La figura 17B corresponde a un esquema que muestra las ramificaciones de las branquias. En el acercamiento de la cabeza del embrión en estadio de desarrollo de las branquias, se observó a las vesículas ópticas sin pigmentación. Además, se observó a la rama anterior de las branquias con siete

ramificaciones y la rama posterior de las branquias alargada (Fig. 17C). La aleta caudal se muestra más desarrollada y alargada que en el estadio de yema de las branquias (Fig. 17D).

5.2.16 MORFOLOGÍA EXTERNA DEL ESTADIO A LA ECLOSIÓN (ESTADIO 25)

DE *H. vertebralis*

Los embriones de *H. vertebralis* iniciaron su etapa de vida libre a partir de este estadio. En el acercamiento dorsal de la cabeza del embrión (Fig. 18A) se observó la formación de los ojos del embrión. En el acercamiento ventral de la cabeza del embrión (Fig. 18B) se observó al opérculo cubriendo por completo a las branquias, en el lado derecho del embrión. La boca presenta dientes con pigmentación oscura. En el embrión entero (Fig. 18C) se observó al cuerpo del embrión pigmentado. En este estadio, la aleta caudal alcanzó su máxima longitud. El embrión adquirió la apariencia de un renacuajo.

6. DISCUSIÓN

En este estudio se describe el desarrollo embrionario de *Hyloxalus vertebralis* (Anura: Dendrobatidae) desde el clivaje hasta la eclosión de los renacuajos, con énfasis en la morfología interna de la gástrula. El desarrollo de *H. vertebralis* fue dividido en 25 estadios para la fácil interpretación de los resultados. La tabla del desarrollo propuesta describe los cambios morfológicos más importantes y característicos de cada estadio, y permite la comparación con otras tablas de anuros elaboradas con anterioridad. Los estadios fueron determinados a partir de la tabla de desarrollo de *E. machalilla*, debido a la similitud existente. En *E. machalilla*, los primeros estadios fueron establecidos a partir de la tabla de desarrollo del organismo modelo *X. laevis* (Niewkoop y Faber, 1994). A partir de los estadios de néurula se utilizó la tabla de desarrollo general del desarrollo de anfibios (Gosner, 1960) porque se observaron diferencias en la morfología de los embriones de *E. machalilla* en comparación con *X. laevis*.

El estudio se lo realizó dentro de un marco comparativo con otros anuros, ya que los estudios comparativos realizados en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE determinaron que no existe un único patrón de desarrollo embrionario en anuros (Elinson y del Pino, 2012; del Pino *et al.*, 2007; Moya *et al.*, 2007).

6.1 EL DESARROLLO TEMPRANO DE *H. vertebralis*

6.1.1 MORFOLOGÍA DEL CLIVAJE Y BLÁSTULA DE *H. vertebralis*

El proceso de clivaje en *H. vertebralis* es holoblástico y sincrónico (Figs. 2-5). Cada una de las divisiones celulares tardó aproximadamente una hora y media en completarse, hasta el cuarto evento de clivaje. Este resultado es ligeramente más lento que lo observado en *E. machalilla*, siendo una hora aproximadamente el tiempo que tarda cada evento de clivaje en los embriones de esta especie (del Pino *et al.*, 2004). En contraste, las ranas del género *Engystomops* tan solo necesitan 20 minutos para completar cada división celular (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Se puede concluir que el proceso de clivaje es lento en los embriones de *H. vertebralis*, en comparación a lo observado en las ranas túngara (*Engystomops*). Este resultado puede deberse a la gran cantidad de yema que necesitan los grandes huevos de *H. vertebralis*, característica importante de aquellos embriones que se desarrollan en nidos terrestres.

Los planos de división celular encontrados en *H. vertebralis* coinciden con el patrón descrito para *E. machalilla*, *X. laevis* y *Eleutherodactylus coqui* (del Pino *et al.*, 2004; Niewkoop y Faber, 1994; Townsend y Stewart, 1985). Sin embargo, *Gastrotheca riobambae* muestra la mayor desviación en cuanto al patrón estándar de clivaje de los anfibios. Esta rana exhibe clivaje asíncrono, con surcos de clivaje irregulares (Elinson y del Pino, 1985). Además, en esta anuro el tercer y cuarto evento de clivaje procede de forma vertical, atravesando el eje animal-vegetal (del Pino y Loor-Vela, 1990).

Al exterior del embrión en el estadio de blástula, se observaron pequeños blastómeros en el hemisferio animal y grandes blastómeros en el hemisferio vegetal. Esta diferencia en el tamaño de los blastómeros es el resultado de la acumulación de yema en el hemisferio vegetal del embrión (Gilbert, 2010). Al interior del embrión, se observó al blastocele desplazado hacia el hemisferio animal. Estas características son similares a lo observado en *X. laevis* y *E. machalilla* (del Pino *et al.*, 2004; Niewkoop y Faber, 1994).

6.1.2 MORFOLOGÍA DE LA GÁSTRULA Y PATRÓN DE GASTRULACIÓN DE *H. vertebralis*

Los movimientos de involución, epíbole y convergencia y extensión dorsales son eventos conservados entre ranas, peces y otros vertebrados; sin embargo, variaciones temporales han sido detectados en anuros (Elinson y del Pino, 2012). El tiempo en el que ocurren los diversos eventos de la gastrulación varían entre ranas con distintas velocidades de desarrollo (del Pino *et al.*, 2007). La relativa independencia entre los procesos morfogenéticos de la gastrulación posiblemente ha permitido la evolución de distintos patrones de gastrulación en los anuros (Ewald *et al.*, 2004).

El inicio de la gastrulación se evidencia al exterior del embrión, a través de la formación del labio dorsal del blastoporo (Gilbert, 2010). La hendidura blastoporal fue observada en la región subecuatorial del embrión de *H. vertebralis*. Las células ubicadas en esta zona adquieren una forma de botella, debido a que se constriñen activamente en su superficie apical y se alargan en el eje apical-basal, lo que resulta en la formación de una invaginación superficial (Keller *et al.*, 2003). Estas características morfológicas presentes en *H. vertebralis* son similares a lo observado en *X. laevis*, *E. machalilla* y *Epipedobates anthonyi* (Gilbert, 2010; Moya *et al.*, 2007; del Pino *et al.*, 2004).

El proceso de involución es promovido por la rotación vegetal de las células endodermales (Winklbauer y Schürfeld, 1999). En la gástrula media de *H. vertebralis*, se observó al cleft de Brachet (Fig. 8D). La formación de este surco sugiere la involución de las células de mesodermo y la rotación vegetal de las células de endodermo. El cleft de Brachet ha

sido detectado en la gástrula de varios anuros como *E. machalilla*, *G. riobambae* y *X. laevis* (Elinson y del Pino, 2012). El evento de rotación vegetal inicia en el lado dorsal y se expande hacia los lados hasta alcanzar la zona ventral (Winklbauer y Schürfeld, 1999). Por este motivo, el cleft de Brachet fue observado en la zona dorsal y ventral del embrión de *H. vertebralis*.

Otra característica relacionada con la rotación vegetal es el movimiento de las células del piso del blastocele hacia el techo del mismo (Stern, 2004). En la gástrula tardía (estadio 12) de *H. vertebralis*, se empieza a observar el desplazamiento de las células del piso del blastocele. Este movimiento generó la reducción en el tamaño del blastocele (Fig. 9D). La matriz de fibronectina, ubicada en la superficie interna del techo del blastocele, dirige el movimiento de las células del piso del blastocele y la epíbole (Marsden y DeSimone, 2001).

El movimiento de epíbole genera la expansión de las células del hemisferio animal para cubrir a todo el embrión. Como resultado de este movimiento se reduce el número de capas celulares que conforman el techo del blastocele (Gilbert, 2010). En el estadio de gástrula temprana de *H. vertebralis*, se observó que el techo del blastocele estaba conformado por dos a tres capas de células (Fig. 7E); mientras que en el estadio de gástrula tardía (estadio 12.5) este se reduce a una capa de células (Fig. 10E). La reducción a una sola capa de células en el techo del blastocele es compartido con *E. machalilla* y el grupo hermano de los anuros, los urodelos. En contraste, el techo del blastocele de *X. laevis* contiene dos capas celulares, una vez que la epíbole ha finalizado (Keller, 1980). En *X. laevis*, la epíbole incluye la división y expansión de las células superficiales y la intercalación radial de las células profundas del techo del blastocele (Keller *et al.*, 2003). En *H. vertebralis*, se sugiere que la intercalación radial no solo se produce entre las células profundas del techo del blastocele, sino que este proceso también ocurre entre las células superficiales y las profundas, como sucede en los urodelos (Anexo 2). Posiblemente la

reducción a una sola capa de células en el techo del blastocele está asociada al gran tamaño de los huevos de los anfibios que presentan esta característica.

Anuros que desarrollan techos del blastocele transparente, conformados por una capa de células, incluyen a *E. coqui* y *G. riobambae*. Esta característica facilita la observación del ingreso de células al interior del embrión (Elinson y del Pino, 2012). Bisecciones en los estadios 12 y 12 avanzado (no se muestra) permitieron observar que el techo del blastocele de *H. vertebralis* no se vuelve translucido, a pesar de estar conformado por una sola capa de células. Este resultado posiblemente se relaciona con la pigmentación celular que presentan los embriones de esta rana. El techo del blastocele de *E. machalilla* se vuelve ligeramente translucido (del Pino *et al.*, 2004), pero al igual que *H. vertebralis* sus huevos son pigmentados, por esta razón una fácil observación al interior del embrión no es posible.

La formación del arquenterón es uno de los objetivos de la gastrulación (Ewald *et al.*, 2004). En *H. vertebralis*, esta cavidad fue observada por primera vez en el estadio de gástrula media. Los eventos de elongación e inflación del arquenterón son independientes entre sí (Ewald *et al.*, 2004). La elongación del arquenterón en *H. vertebralis* se inicia en el estadio de gástrula tardía (estadio 12). La inflación del arquenterón fue observado en la post-gástrula, después del cerramiento del blastoporo. Estos resultados son similares a lo observado en *E. machalilla* y *G. riobambae*, pero contrastan con *X. laevis* (Elinson y del Pino, 2012). En *X. laevis*, la elongación del arquenterón empieza en la gástrula media y la inflación del arquenterón se produce en la gástrula tardía (estadio 12). La inflación del arquenterón en embriones de anuros se produce principalmente por el influjo de líquido proveniente del blastocele (Ewald *et al.*, 2004). Este hecho puede estar relacionado con la desaparición completa del blastocele en la post-gástrula de *H. vertebralis*, cuando el arquenterón alcanza su tamaño máximo. Mientras que, la elongación

del arquenterón es el resultado de la combinación de la rotación vegetal, epíbole, convergencia y extensión dorsales, entre otros factores (Ewald *et al.*, 2004). Debido a que los movimientos de convergencia y extensión dorsales están retrasados en ranas con desarrollo lento, se sugiere que estos movimientos no intervienen en el alargamiento del arquenterón de estas especies.

En *H. vertebralis*, se observaron a los labios del blastoporo gruesos y un collar circumblastoporal conspicuo (Figs. 10C y 11D). Estas características posiblemente indican la separación temporal de los movimientos de convergencia y extensión dorsales de la gastrulación (Elinson y del Pino, 2012). En *X. laevis*, las células que involucionan durante la gastrulación migran lejos de los labios del blastoporo, a través del arquenterón alargado. La gastrulación y la convergencia y extensión dorsales son eventos solapados en esta rana. El collar circumblastoporal ha sido observado en diferentes especies de dendrobátidos y *G. riobambae* (Moya *et al.*, 2007). Sin embargo, en *H. vertebralis* y otros dendrobátidos esta estructura no da lugar a un disco embriónico, como sucede con *G. riobambae* (Elinson y del Pino, 1985).

Se ha demostrado que los movimientos de convergencia y extensión dorsales son los principales responsables de cerrar al blastoporo (Ewald *et al.*, 2004). En ausencia de estos movimientos en la gastrulación de *H. vertebralis* y otros dendrobátidos, se considera que el engrosamiento y convergencia ventrales junto a otras fuerzas generan el cerramiento del blastoporo en estas especies (Elinson y del Pino, 2012).

El notocordio no fue observado en *H. vertebralis* en el estadio de post-gástrula, después del cerramiento del blastoporo. Este resultado es diferente al ser comparado con *E. machalilla*, debido a que el notocordio es observado en el estadio 13 en esta especie (Benítez y del Pino, 2002). Posiblemente la sección transversal de *H. vertebralis* analizada era muy caudal, con

relación al embrión. Sin embargo, en la néurula temprana (estadio 14) de *H. vertebralis* se logró observar al notocordio (Hervas y del Pino, 2013).

Estudios con inmunodetección son necesarios para confirmar los resultados obtenidos en este estudio. La expresión del gen *Brachyury* es muy utilizada para determinar a los tejidos especificados como mesodermo y aquellos que sufren convergencia y extensión dorsales. Por otro lado, la expresión de *Lhx1* permite la identificación del labio dorsal del blastoporo, el notocordio y la separación del endomesodermo y el ectodermo por el cleft de Brachet (Elinson y del Pino, 2012).

Las diferencias encontradas en la gastrulación de distintos anuros han permitido la agrupación entre aquellos que comparten características (Anexo 3). Estudios comparativos realizados en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE determinaron la existencia de tres patrones de gastrulación en diferentes anuros (del Pino *et al.*, 2007; Moya *et al.*, 2007).

El primer modo de gastrulación lo muestran *X. laevis* y las ranas del género *Engystomops*. El tiempo que tardan *X. laevis* y las ranas túngara (*Engystomops*) desde la formación del labio dorsal del blastoporo hasta el final de la gastrulación es de 5.75 y 11 horas, respectivamente (Romero-Carvajal *et al.*, 2009; Niewkoop y Faber, 1994). En estas especies la elongación del arquenterón se produce en la gástrula temprana; mientras que, el alargamiento del notocordio se produce en la gástrula media (del Pino *et al.*, 2007; Moya *et al.*, 2007).

El segundo modo de gastrulación incluye a *E. coqui* y ranas de la familia Dendrobatidae. *Epipedobates machalilla* tarda 1.5 días en avanzar desde la formación del labio dorsal del blastoporo hasta el final de la gastrulación (del Pino *et al.*, 2004). En las ranas dendrobátidas y *E. coqui* la elongación del arquenterón inicia en la gástrula tardía y la elongación del notocordio es observada en el estadio de post-gástrula (del Pino *et al.*, 2007).

En el tercer modo de gastrulación se encuentra *G. riobambae*. Esta especie tarda 7 días para completar el proceso de gastrulación (del Pino y Escobar, 1981). La elongación del arquenterón y del notocordio se produce en la post-gastrula, después del cierre del blastoporo (Elinson y del Pino, 1985). Una característica que diverge por completo de otras ranas es la presencia del disco embriónico, a partir del cual se deriva el cuerpo del embrión (del Pino y Elinson, 1983).

Se sugiere que *H. vertebralis* presenta un patrón de gastrulación igual que los otros dendrobátidos estudiados con anterioridad, como era esperado. Como se mencionó anteriormente, esta especie tarda 1.6 días en avanzar desde la formación del labio dorsal del blastoporo hasta el final de la gastrulación. El alargamiento del arquenterón se observa en el estadio de gástrula tardía (estadio 12) y el notocordio en la néurula temprana (Hervas y del Pino, 2013). Se necesita realizar más estudios para confirmar el estadio en el que se observa por primera vez al notocordio en esta especie.

6.1.3 MORFOLOGÍA DE LA NÉURULA DE *H. vertebralis*

Al iniciar el proceso de neurulación, se forma la placa neural a partir de una porción del ectodermo dorsal. Todas las células nerviosas de los vertebrados se derivan de la placa neural (Gilbert, 2010; Wolpert *et al.*, 2007). En *H. vertebralis*, la placa neural fue observada por primera vez en la néurula temprana (estadio 13.5). En *X. laevis*, *E. machalilla*, *Dendrobates auratus* y ranas del género *Engystomops*, se observa el mismo patrón morfológico, donde el inicio de la neurulación está determinado por la formación de la placa neural (Hervas y del Pino, 2013; Harrington *et al.*, 2009; Romero-Carvajal *et al.*, 2009; del Pino *et al.*, 2004).

A medida que avanza el proceso de neurulación, el embrión y la placa neural se alargan en el eje antero-posterior (Gilbert, 2010). En la néurula temprana (estadio 14) de *H. vertebralis*, se observan a la placa neural alargada y los pliegues neurales empezando a elevarse en la zona más rostral. En la néurula media, los pliegues neurales se elevan en los bordes laterales de la placa neural. Los pliegues neurales se observan cercanos en la línea media del cuerpo del embrión. Como resultado de este acercamiento, el surco neural se forma en la parte media de la placa neural. Estas características son compartidas con *X. laevis*, ranas del género *Engystomops* y otras especies de dendrobátidos (Hervas y del Pino, 2013; Harrington *et al.*, 2009 Romero-Carvajal *et al.*, 2009; del Pino *et al.*, 2004).

Finalmente los pliegues neurales se fusionan para formar el tubo neural. La formación del tubo neural es el principal objetivo de la neurulación (Wolpert *et al.*, 2007). Una vez que esta estructura se ha formado, la región más anterior se diferencia en el cerebro y la región más posterior en la medula espinal, durante la organogénesis (Gilbert, 2010).

6.1.4 MORFOLOGÍA DE LOS EMBRIONES DE *H. vertebralis* DESDE EL ESTADIO DE ARCOS BRANQUIALES (ESTADIO 18.5) HASTA LA ECLOSIÓN DEL RENACUAJO (ESTADIO 25)

Durante los estadios avanzados del desarrollo, la formación de los órganos de los organismos inicia a partir de las tres capas germinales diferenciadas (Wolpert *et al.*, 2007). Debido a que en este estudio solo se analiza la morfología externa de los embriones de *H. vertebralis*, solo algunos de los órganos formados se observan. En otro estudio realizado sobre

esta especie, se pueden observar los diferentes órganos que se forman al interior del embrión (Hervas, 2012; Hervas y del Pino, 2013).

Los pronefros constituyen un órgano excretor que se deriva del mesodermo. Este órgano se ubica a cada lado del embrión en desarrollo (Asashima *et al.*, 2009; Drawbridge *et al.*, 2003). En *H. vertebralis*, este órgano fue observado por primera vez en el estadio de arcos branquiales. Debido a que no se tienen imágenes de estadios anteriores no se puede establecer el momento en que aparecen estas estructuras. Sin embargo, en otro estudio realizado en la misma especie, se determinó que estas pueden ser observadas a partir del estadio de néurula tardía. Este resultado fue similar a lo observado en *D. auratus*, pero contrasta con *X. laevis* (Hervas, 2012). En *X. laevis*, los pronefros son observados en estadios más tempranos, a partir del estadio de néurula temprana (Asashima *et al.*, 2009).

Una vez que se han formado los tres arcos branquiales en la zona anterior de la cabeza, en el último arco branquial empiezan a desarrollarse las branquias. El número de ramificaciones que presentan las branquias es una característica específica para cada especie de dendrobátido (del Pino *et al.*, 2004). En el estadio de desarrollo completo de las branquias de *H. vertebralis*, fueron observadas 8 ramificaciones en la rama anterior de las branquias (Hervas, 2012). Al comparar este resultado con otros dendrobátidos, se puede determinar que este número de ramificaciones es similar a lo observado en *Epipedobates tricolor* (Anexo 4) pero contrasta con *E. machalilla*, anuro que presenta tan solo 6 ramificaciones (del Pino *et al.*, 2004).

Las vesículas ópticas que se desarrollan en el cerebro anterior, son de origen ectodérmico. En *H. vertebralis*, las vesículas ópticas fueron observadas a partir del estadio de yema de las branquias (estadio 19). Sin embargo, al interior del embrión fueron observados en el estadio de desarrollo de las branquias (estadio 20.5) (Hervas, 2012). A pesar de que se deben

realizar más estudios al interior del embrión de *H. vertebralis*, se puede determinar que existe un retraso en la formación de las vesículas ópticas y que estas estructuras son menos prominentes en comparación con *X. laevis* (Niewkoop y Faber, 1994). El ojo completamente formado de *H. vertebralis* fue observado en el estadio de desarrollo completo de las branquias (estadio 23) (Hervas, 2012). Los resultados obtenidos para *H. vertebralis* concuerdan con lo analizado en *E. machalilla*, pero contrasta con *X. laevis*.

La formación de los órganos analizados es estudio es retrasado en varias especies de dendrobátidos, al comparar estos resultados con *X. laevis*. Este retraso puede estar asociado con el desarrollo lento que presentan los dendrobátidos. Además, el hecho de que pertenezcan a la misma familia les confiere varias características que son compartidas entre estas ranas.

En el estadio de desarrollo completo de las branquias, los embriones de *H. vertebralis* desarrollaron opérculo, al igual que lo hacen otras especies de ranas (del Pino *et al.*, 2004; Gosner, 1960). El opérculo fue observado recubriendo por completo a las branquias del lado derecho del embrión (Fig. 18B). Además, se observó pigmentación en los dientes en este estadio a la eclosión. Estas características son compartidas con *E. machalilla* (del Pino *et al.*, 2004).

6.2 TAMAÑO DEL HUEVO Y TIEMPO DEL DESARROLLO TEMPRANO EN DIFERENTES ESPECIES DE DENDROBÁTIDOS

Entre las distintas especies de dendrobátidos estudiadas previamente, se ha determinado que existe una alta variabilidad en el tamaño de sus huevos (Montenegro, 2007; del Pino *et al.*, 2004). *Epipedobates machalilla* presenta el menor tamaño de huevo; mientras que, *D. auratus* el huevo más grande, 1.6 y 3.5 mm respectivamente. *Hyloxalus vertebralis* presenta un tamaño

promedio del huevo de 2.6 mm. A pesar de la diferencia en el tamaño de los huevos entre varios dendrobátidos, no se considera que esta característica sea un factor influyente en el patrón de gastrulación. Las ligeras diferencias encontradas en el proceso de gastrulación entre estas especies no las hace salir del patrón de gastrulación al que pertenecen (del Pino *et al.*, 2007; Moya *et al.*, 2007).

El alargamiento del notocordio ocurre en la post-gástrula de todos los dendrobátidos. Sin embargo, el alargamiento del arquenterón empieza un poco más temprano en aquellas ranas dendrobátidas con huevos grandes, una de ellas es *D. auratus* (del Pino *et al.*, 2007). Un collar circumblastoporal conspicuo se observa en todos los dendrobátidos. No obstante, se determinó que la acumulación de células en esta zona es menos pronunciada en *D. auratus*, a pesar del gran tamaño que posee su huevo (del Pino *et al.*, 2007; Moya *et al.*, 2007). Estos resultados en *D. auratus* pueden estar asociados a la cantidad de huevos que son colocados en cada postura, característica inversamente proporcional con el tamaño de sus huevos. Se sugiere que es pequeña la cantidad de huevos que produce esta especie y por lo tanto se observa que su desarrollo es un poco más acelerado que lo observado en otras especies de dendrobátidos, hecho que posibilitaría un aumento en la probabilidad de sobrevivencia de los embriones.

Los embriones de *H. vertebralis* requieren de 18 días aproximadamente para completar su desarrollo, desde el estadio de dos células hasta la eclosión del renacuajo, bajo condiciones del laboratorio. En seis especies de dendrobátidos, el tiempo requerido desde la fertilización hasta la eclosión del renacuajo es de 19 a 21 días. Por lo tanto, se observa que estas ranas de la familia Dendrobatidae no muestran gran variación en su velocidad de desarrollo y pueden ser consideradas de desarrollo lento en comparación a *X. laevis* (del Pino *et al.*, 2007; del Pino *et al.*, 2004). Sin embargo, el tiempo necesario para completar el proceso de gastrulación es más

variable entre estas especies de dendrobátidos (Tabla 7). Para avanzar desde la formación del labio dorsal del blastoporo hasta el cierre del mismo, son necesarios de 1.5 a 3 días (del Pino *et al.*, 2007; Montenegro, 2007; del Pino *et al.*, 2004). El tiempo que tarda *H. vertebralis* para completar el proceso de gastrulación es de 1.6 días. El tiempo necesario para completar el proceso de gastrulación de *H. vertebralis* se encuentra dentro del rango observado en otras especies de dendrobátidos.

A partir de las comparaciones realizadas, se sugiere que el tamaño del huevo que presentan los embriones de ranas dendrobátidas no es la causa principal para las leves diferencias observadas en los tiempos de desarrollo y algunas variaciones temporales en los eventos de la gastrulación. Además, parece que el patrón de gastrulación es muy conservado entre los distintos dendrobátidos estudiados. Estos resultados pueden deberse a que comparten la misma estrategia reproductiva y pertenecen a la misma familia de anuros.

6.3 IMPORTANCIA DE LA MODULARIDAD EN EL DESARROLLO TEMPRANO DE RANAS CON DISTINTAS ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS

En varios estudios realizados en embriones de anuros se asegura que la modularidad en el desarrollo temprano está asociada a los distintos modos de reproducción y la filogenia que presenta cada grupo. Estos resultados fueron obtenidos después de comparar modos de reproducción, velocidades del desarrollo y tamaños del huevo en diferentes especies de anuros (Elinson y del Pino, 2012; del Pino *et al.*, 2007; Moya *et al.*, 2007).

Las características reproductivas de *X. laevis* y las ranas túngara (*Engystomops*) posiblemente han permitido el rápido desarrollo que muestran sus embriones. *Xenopus laevis*

coloca cientos de huevos en el agua, con un diámetro aproximado de 1.2 mm (Duellman y Trueb, 1986). Las ranas del género *Engystomops* colocan sus huevos en nidos de espuma. *Engystomops randi* produce alrededor de 110 huevos con un diámetro aproximado de 1.1mm (Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Se puede observar una relación inversa entre el tamaño de los huevos y la cantidad de huevos colocados en cada postura. Se sugiere que los embriones de estas dos especies se desarrollan de manera rápida debido a su estrategia reproductiva, caracterizada por no existir cuidado parental, gran cantidad de huevos en cada postura y tamaño pequeño del huevo (Elinson y del Pino, 2012; del Pino *et al.*, 2007; Moya *et al.*, 2007). Al estar expuestos a predación, desecación y otras presiones selectivas, se considera que estos factores promueven el rápido desarrollo de los embriones de estos anuros.

Por otro lado, las especies de anuros que muestran desarrollo lento son *E. machalilla* y *G. riobambae*. La rana dendrobátida *E. machalilla* coloca alrededor de 15 huevos en nidos terrestres. Los embriones muestran un diámetro aproximado de 1.6 mm (del Pino *et al.*, 2004). La rana marsupial *G. riobambae* incuba alrededor de 128 huevos en una bolsa de integumento ubicada en la espalda de la hembra. El diámetro promedio que presentan los embriones de esta especie es de 3 mm (del Pino y Escobar, 1981). El desarrollo lento de estas dos ranas puede estar relacionada con el cuidado parental que poseen como estrategia reproductiva. (del Pino *et al.*, 2007; Duellman, 1992). En la mayoría de los casos, la disminución en el tamaño de la postura y mayor tamaño de los huevos están relacionados con el cuidado parental (Duellman, 1992). Sin embargo, en *G. riobambae* se observa que es grande el tamaño de la puesta, esto puede deberse a que el tamaño de la rana adulta es grande, en comparación con el tamaño que muestran los dendrobátidos.

Desde hace mucho tiempo se considera que existe asociación entre las estrategias reproductivas y el desarrollo embrionario de anuros (Duellman y Trueb, 1994; Duellman, 1992; del Pino y Loor-Vela, 1990; Elinson y del Pino, 1985). El cuidado parental ofrece una ventaja adaptativa al brindar mayor protección en contra de los depredadores y evitar la desecación de los embriones (Duellman, 1992). Posiblemente por esta razón los embriones con cuidado parental se desarrollan lentamente, en comparación con aquellos embriones sin cuidado parental.

6.4 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LOS EMBRIONES DE *H. vertebralis*

Los estudios morfológicos deben ser realizados previos a los estudios moleculares. Una vez integradas las características morfológicas de cada etapa del desarrollo embrionario se obtiene una vista completa del sistema (Hausen y Riebsell, 1991). Debido a esto, el presente estudio presenta información general para que posteriormente se puedan realizar estudios moleculares.

La descripción morfológica de *H. vertebralis* ha permitido determinar muchas similitudes con otras especies de la familia Dendrobatidae. Se determinó que los embriones de esta especie tienen un desarrollo lento en comparación a *X. laevis* y las ranas del género *Engystomops*. El desarrollo lento que muestran los dendrobátidos es compartido con la rana marsupial *G. riobambae* (del Pino *et al.*, 2007; Moya *et al.*, 2007). Se propone que estos resultados se deben al cuidado parental que muestran estas especies, una ventaja para los embriones al disminuir su exposición a depredadores (del Pino y Loor-vela, 1990; Duellman, 1992). En la mayoría de los casos, la disminución en el tamaño de la postura y mayor diámetro del huevo está relacionado

con el cuidado parental (Duellman, 1992). En el caso de *H. vertebralis*, coloca en promedio 17 huevos en cada postura y el diámetro que presentan sus huevos es de 2.6 mm. Este número de huevos es bajo y el tamaño de sus huevos son grandes en comparación con aquellos anuros que no muestran cuidado parental (Niewkoop y Faber, 1994; Romero-Carvajal *et al.*, 2009). Por lo tanto, con este estudio se refuerza la teoría de la asociación de la velocidad del desarrollo con las estrategias reproductivas. Además se observa la relación inversa entre el tamaño de los huevos y la cantidad de huevos colocados, característica adaptativa relacionada con la tendencia del desarrollo embrionario temprano terrestres en anuros (Duellman y Trueb, 1994).

El patrón de gastrulación analizado en varias especies de dendrobátidos permite argumentar que este proceso es muy conservado en esta familia de anuros. Las diferencias que existen entre estas ranas es muy leve, a pesar de existir gran variabilidad en el tamaño de sus huevos. Por esta razón, se sugiere que el tamaño del huevo no es un factor importante para que exista modularidad en la gastrulación. Más bien, se propone que diferentes patrones de gastrulación observados en anuros es debido a la relativa independencia de sus eventos morfogenéticos y las diferentes estrategias reproductivas.

Los datos obtenidos en este trabajo se prestan a ser comparados con nuevos estudios a realizarse en el Laboratorio de Biología del Desarrollo. Además, la información obtenida en este estudio incrementa el conocimiento del desarrollo embrionario de los anuros presentes en el Ecuador. El aporte científico del presente estudio puede ser utilizado para programas de conservación de *H. vertebralis*, rana en peligro crítico de extinción.

7. LITERATURA CITADA

Asashima, M., Ito, Y., Chan, T., Michiue, T., Nakanishi, M., Suzuki, K., Hitachi K., Okabayashi K., Kondow A., y Ariizumi, T. 2009. In vitro organogenesis from undifferentiated cells in *Xenopus*. *Developmental Dynamics*. 238: 1309–20.

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

Browder, L., e Iten, L. 1998. *Xenopus* as a Model System in Developmental Biology. an Online reference. (March 4, 1998) Dymamic Development. <http://people.ucalgary.ca/~browder/frogusrus.html> Consulta:11 Marzo, 2013

Coloma, L., Frenkel, C. y Ortiz, D. 2013. *Hyloxalus vertebralis*. an Online reference. AmphibiaWebEcuador. <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios/FichaEspecie.aspx?Id=1256> Consulta:08 Agosto, 2013.

Coloma, L. 1995. Ecuadorian Frogs of the Genus *Colostethus*. Miscellaneous Publication.

Dale, L. 1999. Vertebrate development: Multiple phases to endoderm formation. *Current Biology*. 9: 812–815.

De Robertis, E. M. 2006. Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7: 296–302.

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

del Pino, E. M., Avila, M.-E., Pérez, O. D., Benitez, M.-S., Alarcón, I., Noboa, V., y Moya, I. M. 2004. Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *The International Journal of Developmental Biology*. 48: 663–670.

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

del Pino, E. M., y Elinson, R. P. 1983. A novel development pattern for frog: gastrulation produces an embryonic disk. *Nature*. 306: 589–591.

del Pino, E. M., y Escobar, B. 1981. Embryonic stages of *Gastrotheca riobambae* during maternal incubation and comparison of development with that of other egg-brooding hylid frogs. *Journal of Morphology*. 167: 277–295.

Drawbridge, J., Meighan, C. M., Lumpkins, R., y Kite, M. E. 2003. Pronephric duct extension in amphibian embryos: migration and other mechanisms. *Developmental Dynamics*. 226: 1–11.

Duellman, W. E., y Trueb, L. 1994. *Biology of Amphibians*. McGrawHill Inc. New York. The Johns Hopkins University Press.

Duellman, W. 1992. Reproductive strategies of Frogs. *Scientific American*. 267: 58–65.

Duellman, W. y Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians*. Mc Graw Hill Book Company. New York

Elinson, R. P., y del Pino, E. M. 2012. Developmental Diversity of Amphibians. *Developmental Biology*. 1: 345–369.

Elinson, R. P., y del Pino, E. M. 1985. Cleavage and gastrulation in the egg-brooding, marsupial frog, *Gastrotheca riobambae*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 90: 223–232.

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.

Gilbert, S. F. 2010. *Developmental Biology*. Séptima Edición. Sinauer Associates, Inc.

Gorny, A. K., y Steinbeisser, H. 2012. Brachets's cleft: a model for the analysis of tissue separation in *Xenopus*. *Developmental Biology*. 1: 294–300.

Gosner, K. L. 1960. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica*. 184–190.

Grant, T., Frost, D. R., Caldwell, J. P., Gagliardo, R. O. N., Haddad, C. F. B., Kok, P. J. R., Means, D., Noonan, B., Schargel, W., y Wheeler, W. C. 2006. Phylogenetic systematics of the dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 299: 250–262.

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

Hausen, P., y Riebsell, M. 1991. The Early Development of *Xenopus laevis*. An Atlas of the History.

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

Hervas, F., y del Pino, E. M. 2013. Desarrollo neural, somitogénesis y morfología interna de los embriones de *Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates auratus* (Anura: Dendrobatidae). Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas. 34: 99-112.

Hervas, F. 2012. Morfología, estructura interna y somitogénesis de los embriones de *Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates auratus* (Anura: Dendrobatidae) desde la néurula hasta la eclosión del renacuajo. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

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

Keller, R. 1996. Early Embryonic Development of *Xenopus laevis*. Methods in Cell Biology *Xenopus Laevis: Practical Uses in Cell and Molecular Biology*. 36.

Keller, R. E. 1980. The cellular basis of epiboly: an SEM study of deep-cell rearrangement during gastrulation in *Xenopus laevis*. Journal of Embryology and Experimental Morphology. 60: 201–234.

Lawrence, N., y Morel, V. 2003. Dorsal closure and convergent extension: two polarised morphogenetic movements controlled by similar mechanisms? Mechanisms of Development. 120: 1385–1393.

Marsden, M., y DeSimone, D. W. 2001. Regulation of cell polarity, radial intercalation and epiboly in *Xenopus*: novel roles for integrin and fibronectin. *Development*. 128: 3635–3647.

Montenegro, P. 2007. Morfología de la gástrula en cuatro especies de dendrobátidos con diferentes tamaños de huevos. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Moya, I. M., Alarcón, I., y del Pino, E. M. 2007. Gastrulation of *Gastrotheca riobambae* in comparison with other frogs. *Developmental Biology*. 304: 467–78.

Myers, C. D., Sepich, S. D., y Solnica-Krezel, L. 2002. Convergence and extension in vertebrate gastrule: cell movements according to or in search of identity? *Trends in Genetics*. 18: 447–455.

Newport, J., y Kirschner, M. W. 1982. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell*. 30: 675–686.

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

Romero-Carvajal, A., Sáenz-Ponce, N., Venegas-Ferrín, M., Almeida-Reinoso, D., Lee, C., Bond, J., Ryan, M. J., Wallingford, J. B., y del Pino, E. M. 2009. Embryogenesis and

laboratory maintenance of the foam-nesting túngara frogs, genus *Engystomops* (= *Physalaemus*). *Developmental Dynamics*. 238: 1444–1454.

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

Stancheva, I., El-Maarri, O., Walter, J., Niveleau, A., y Meehan, R. R. 2002. DNA methylation at promoter regions regulates the timing of gene activation in *Xenopus laevis* embryos. *Developmental Biology*. 243: 155–165.

Stern, C. 2004. *Gastrulation: From Cells to Embryo*. University College London.

Townsend, D. S., y Stewart, M. M. 1985. Direct Development in *Eleutherodactylus coqui* (Anura: Leptodactylidae): A Staging Table. *Copeia*. 423–436.

Venegas-Ferrín, M., Sudou, N., Taira, M., y del Pino, E. M. 2010. Comparison of *Lim1* expression in embryos of frogs with different modes of reproduction. *The International Journal of Developmental Biology*. 54: 195–202.

Warner, A. 1984. Physiological approaches to early development. *Recent Advances in Physiology*. 10: 87–123.

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., Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E. y Smith, J. 2007. *Principles of Development*. Current Biology Ltd. Oxford University Press. New York.

Yasuo, H., y Lemaire, P. 2001. Generation of the germ layers along the animal-vegetal axis in *Xenopus laevis*. *The International Journal of Developmental Biology*. 45: 229–235.

8. FIGURAS

Lista de abreviaturas

a,	Arquenterón
ab,	Arco branquial
ac,	Aleta caudal
ah,	Arco hioideo
am,	Arco mandibular
b,	Blastocele
bp,	Blastoporo
ccb,	Collar circumblastoporal
do,	Disco oral
e,	Ectodermo
em,	Endomesodermo
ld,	Labio dorsal del blastoporo
lv,	Labio ventral del blastoporo
pf,	Pronefros
pln,	Pliegues neurales
pn,	Placa neural
ra,	Ramificación anterior de las branquias
rp,	Ramificación posterior de las branquias
o,	Ojo
sn,	Surco neural
so,	Estomodeo
ty,	Tapón de yema
vo,	Vesícula óptica
yb,	Yema de las branquias

Figura 1.

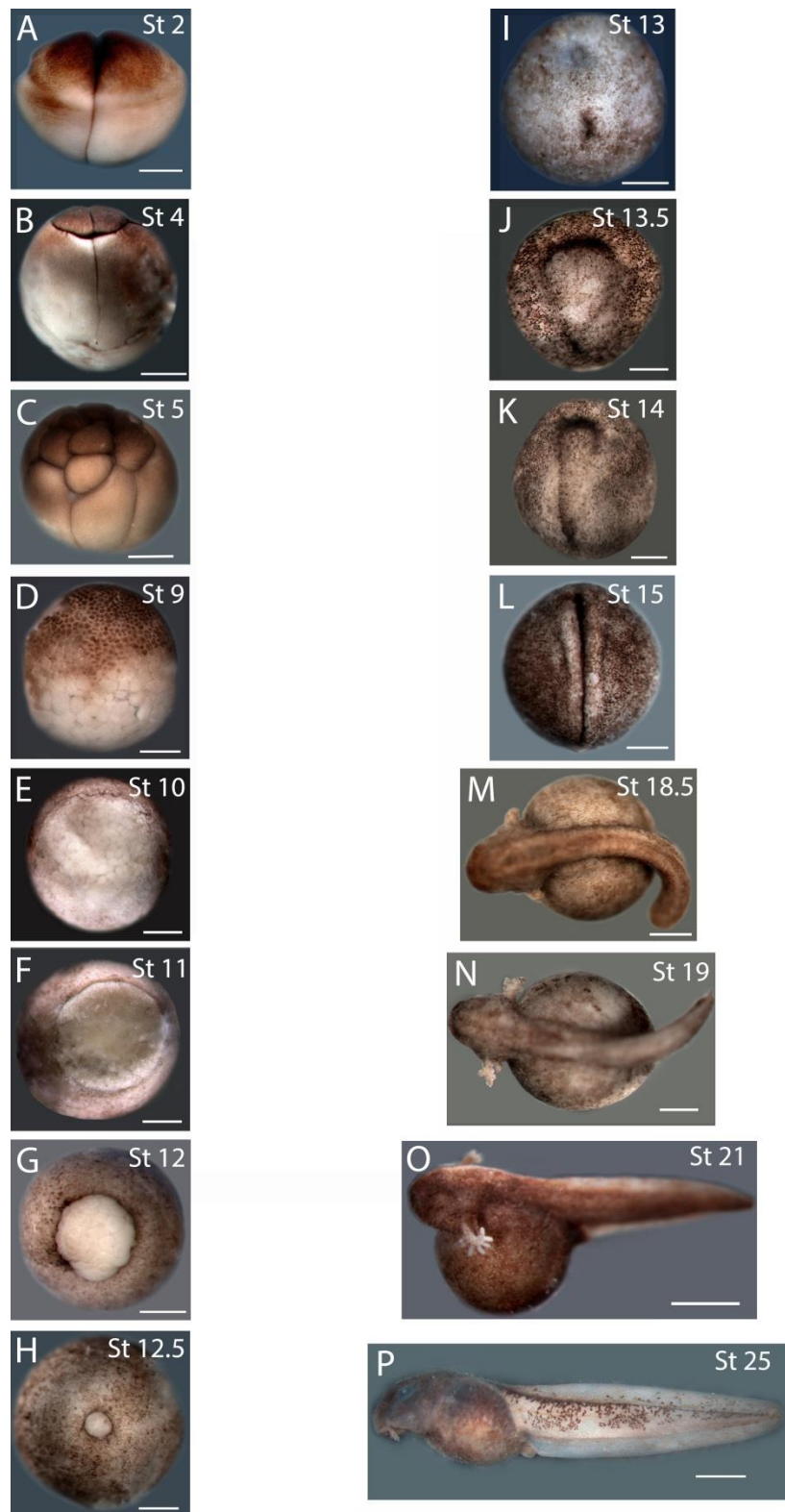


Figura 1. Resumen del desarrollo temprano de *H. vertebralis*: A, B, C, D, O y P son vistas laterales. J, K, L, M y N son vistas dorsales. E, F, G, son vistas vegetales. H e I son vistas posteriores. Las imágenes A–P muestran los estadios representativos del desarrollo temprano de *H. vertebralis*. (A-C) Clivaje. (D) Blástula de células pequeñas. (E) Gástrula temprana. (F) Gástrula media. (G-H) Gástrula tardía. (I) Post-gástrula. (J y K) Néurula temprana. (L) Néurula media. (M) Estadio de arcos branquiales. (N) Estadio de yema de las branquias. (O) Estadio de desarrollo de las branquias. (P) Estadio a la eclosión. Las barras de las imágenes A-N corresponden a 500 μm , en O y P corresponde a 1 mm.

Figura 2.

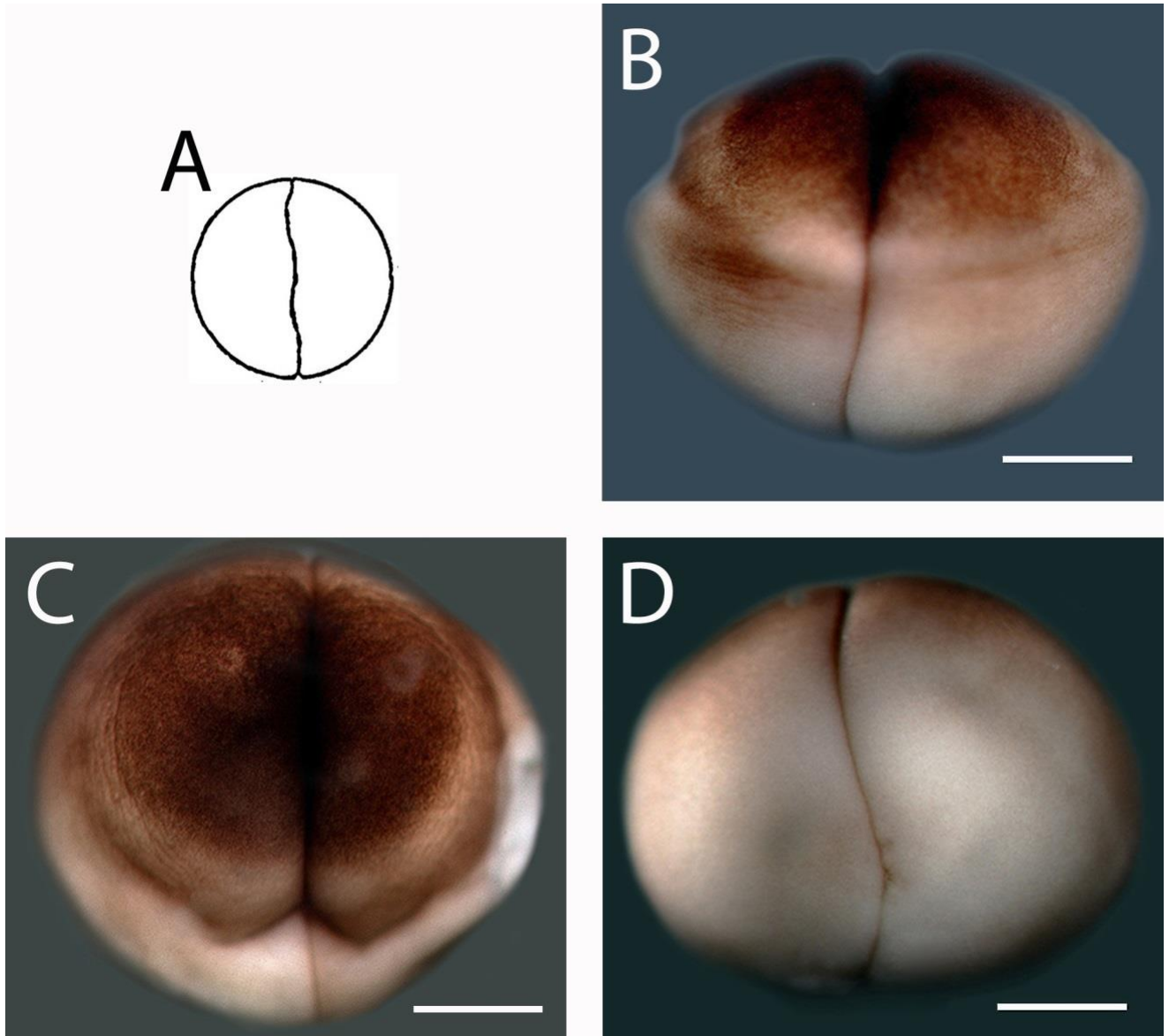


Figura 2. Morfología externa del estadio de 2 células de *H. vertebralis* (estadio 2): (A) Esquema de la vista externa de un embrión de estadio 2. (B) Vista lateral. El hemisferio animal está orientado hacia arriba. Se observa pigmentación en el hemisferio animal. (C) Vista animal. (D) Vista vegetal. Las barras en todas las imágenes corresponden a 500 μm .

Figura 3.

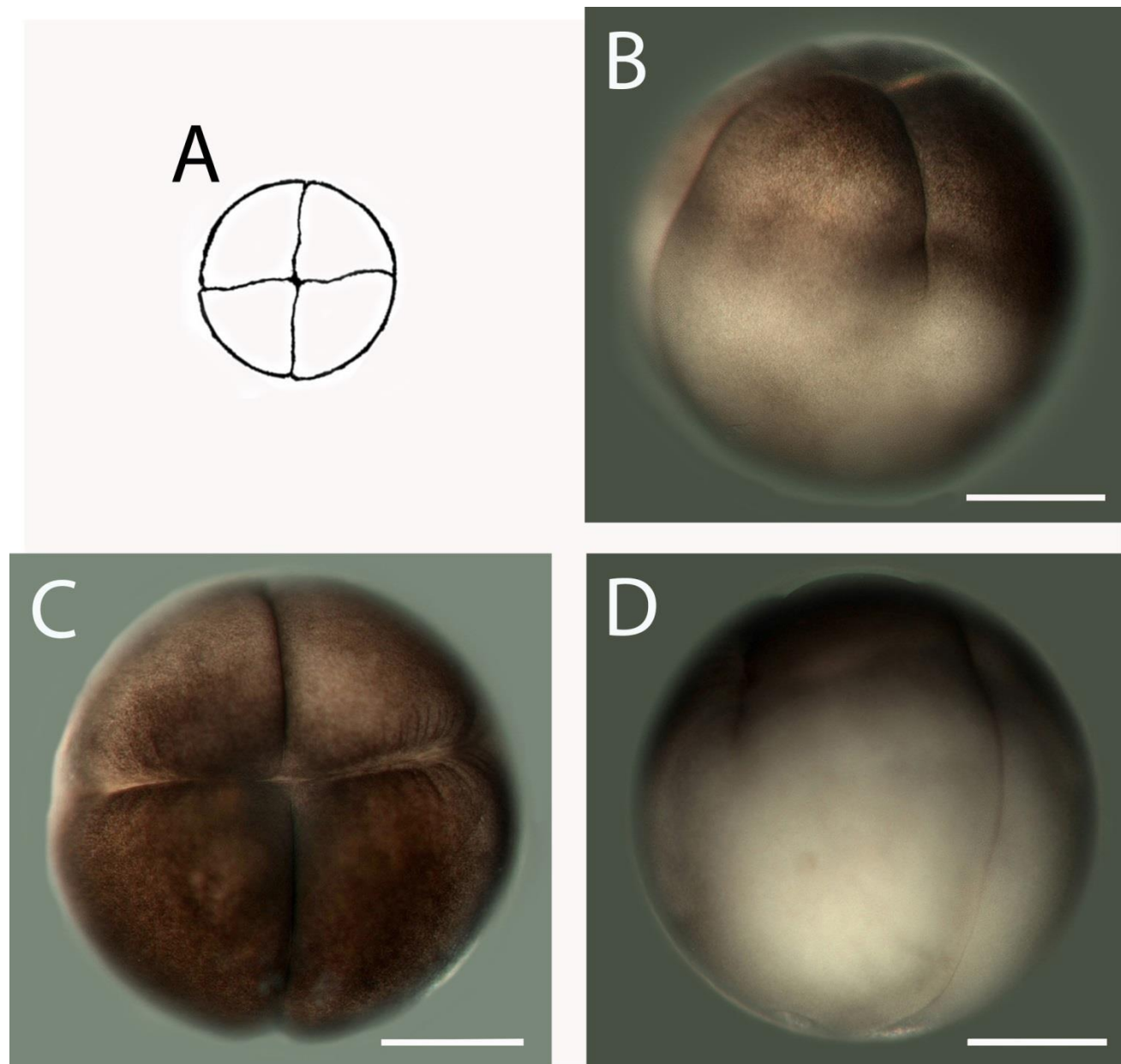


Figura 3. Morfología externa del estadio de 4 células de *H. vertebralis* (estadio 3): (A) Esquema de la vista animal de un embrión de estadio 3. (B) Vista lateral. El hemisferio animal está orientado hacia arriba. Se observa pigmentación en el hemisferio animal. (C) Vista animal. (D) Vista vegetal. Las barras en todas las imágenes corresponden a 500 μm .

Figura 4.

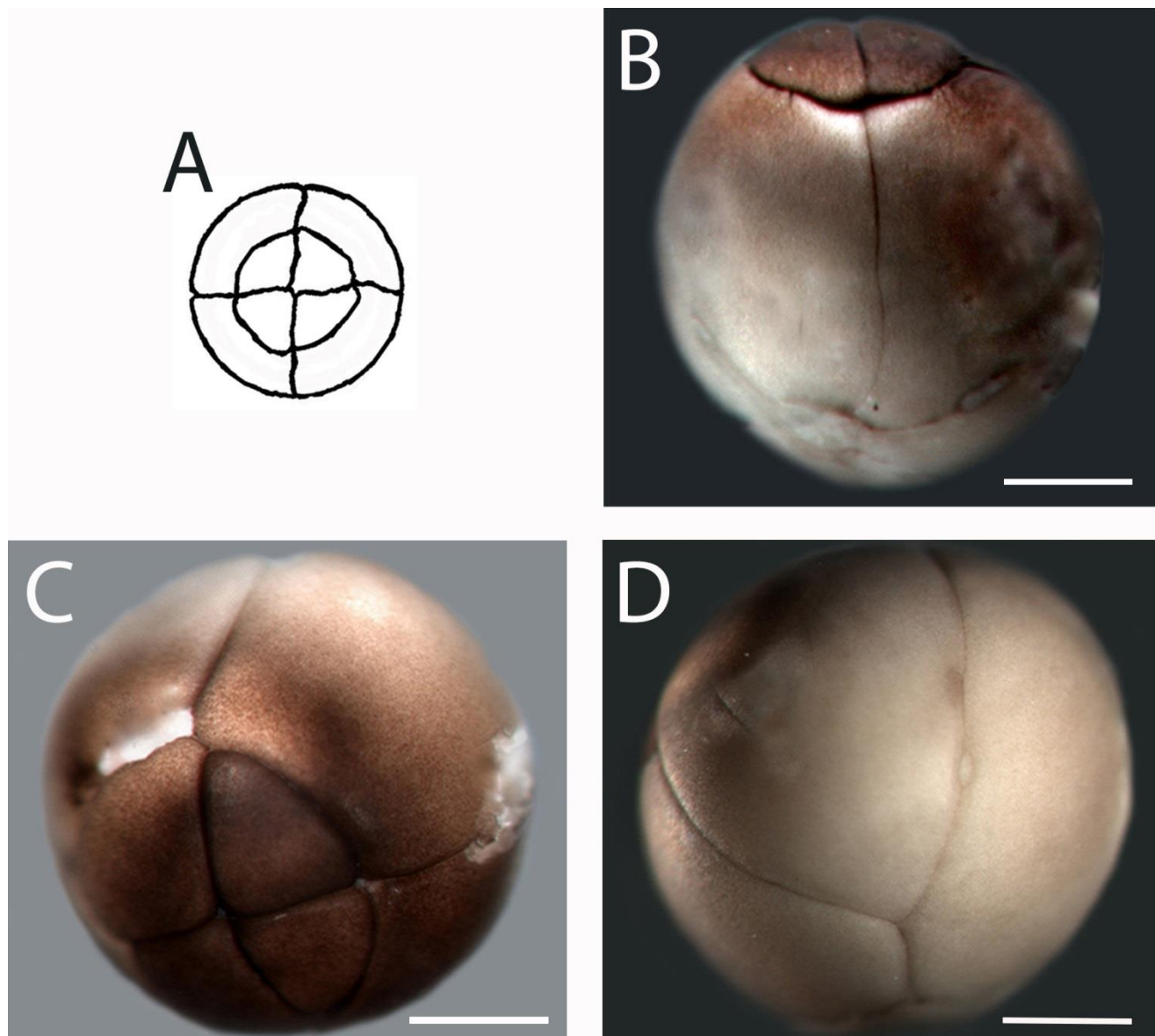


Figura 4. Morfología externa del estadio de 8 células de *H. vertebralis* (estadio 4): (A) Esquema de la vista animal de un embrión de estadio 4. (B) Vista lateral. El hemisferio animal está orientado hacia arriba. Se observa pigmentación en las células animales. (C) Vista animal. (D) Vista vegetal. Las barras en todas las imágenes corresponden a 500 μm .

Figura 5.

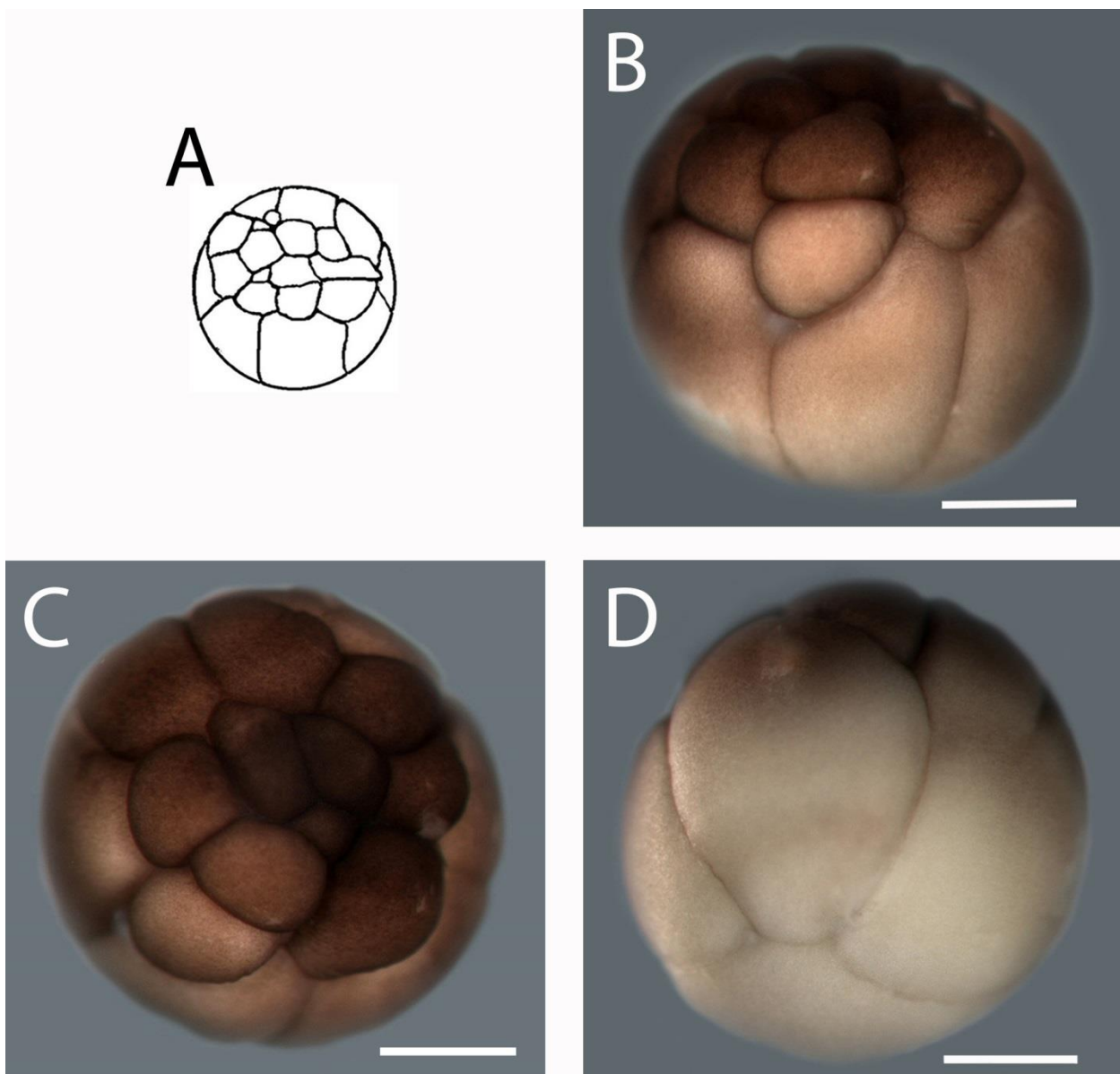


Figura 5. Morfología externa del estadio de 16 células de *H. vertebralis* (estadio 5): (A) Esquema de la vista animal de un embrión en estadio 5. (B) Vista lateral. El hemisferio animal está orientado hacia arriba. Se observa pigmentación en las células animales. (C) Vista animal. (D) Vista vegetal. Las barras en todas las imágenes corresponden a 500 μm .

Figura 6.

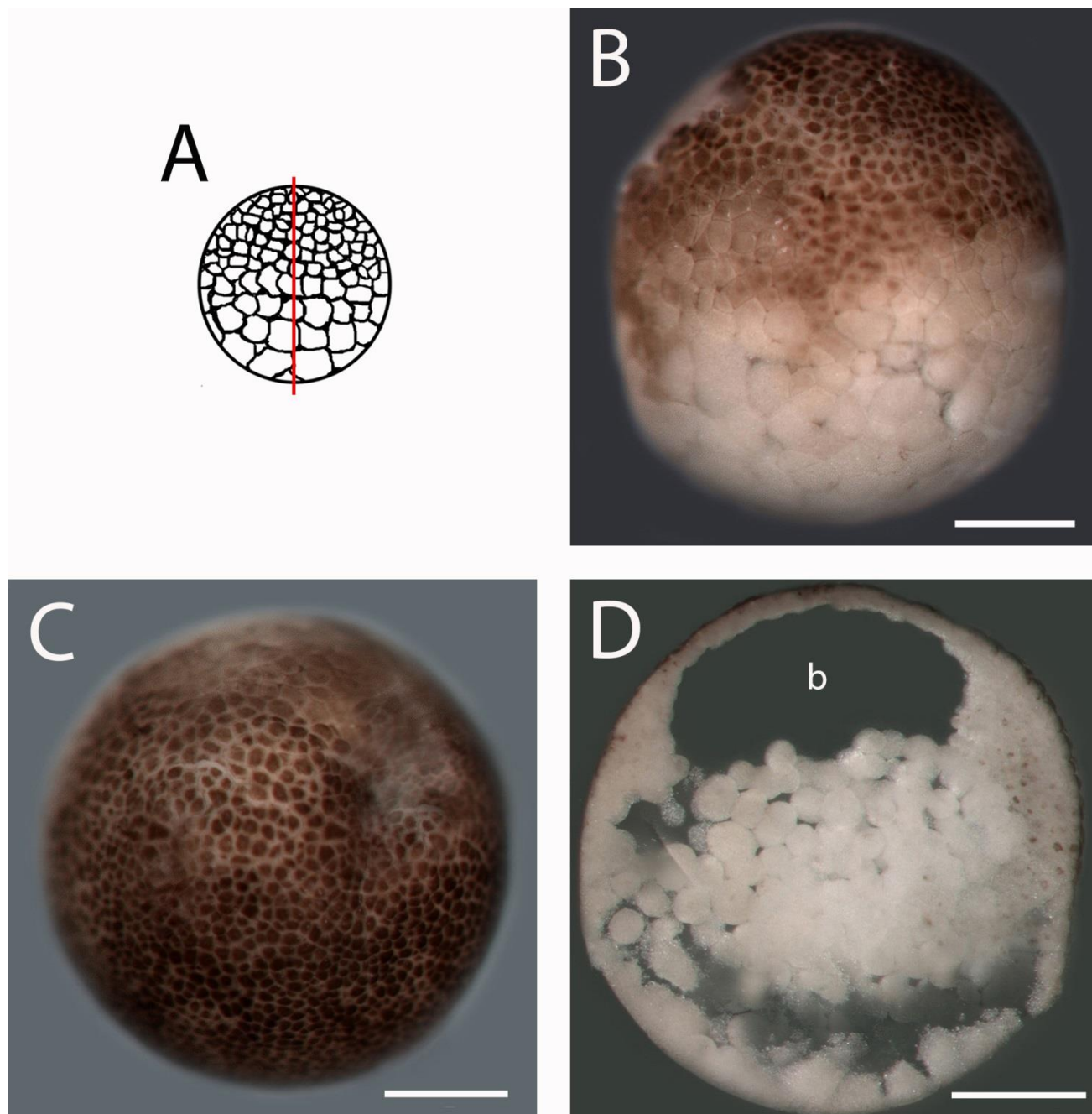


Figura 6. Morfología del estadio de blástula de células pequeñas de *H. vertebralis* (estadio 9): B y C son vistas externas. En A, B y D el hemisferio animal está orientado hacia arriba. (A) Esquema de la vista lateral de un embrión de estadio 9. Se muestra con una línea roja el plano de corte de la sección sagital de la imagen D. (B) Vista lateral. Se observa pigmentación en las células animales. (C) Vista animal. (D) Sección sagital. Se observa la extensión del blastocele. La cavidad en el hemisferio vegetal es un artefacto de la fijación. Las barras en B, C y D corresponden a 500 μm .

Figura 7.

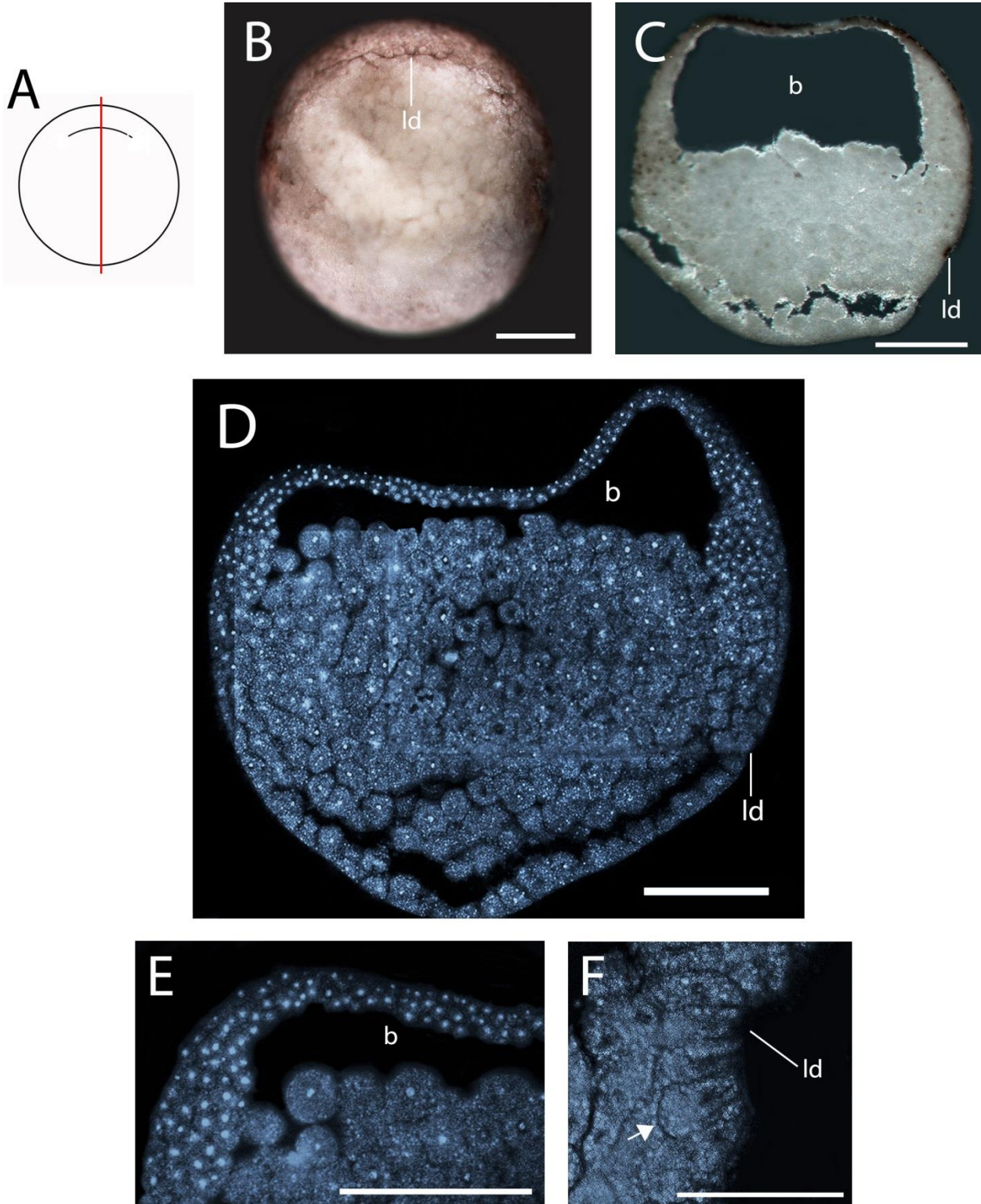


Figura 7. Morfología de la gástrula temprana de *H. vertebralis* (estadio 10): En A y B el lado dorsal está orientado hacia arriba. En C y D el hemisferio animal está orientado hacia arriba. (A) Esquema de la vista vegetal de un embrión de estadio 10. La línea roja indica el plano de corte de las secciones sagitales que se muestran en las imágenes C-F. (B) Vista vegetal externa. Se observa la hendidura del labio dorsal del blastoporo. (C) Sección sagital. Se observa el labio dorsal del blastoporo a la derecha. Nótese la pigmentación en el labio dorsal del blastoporo. El blastocele muestra mayor tamaño que en el estadio anterior. La cavidad en el hemisferio vegetal es un artefacto de la fijación. (D) Fluorescencia nuclear de una sección sagital. Se observa el labio dorsal del blastoporo a la derecha. El colapso del techo del blastocele es un artefacto de la fijación. (E) Acercamiento del techo del blastocele. Se observa que el techo del blastocele está formado por aproximadamente tres capas de células. (F) Acercamiento del labio dorsal del blastoporo. La flecha señala una célula de botella. Las barras en B y C corresponden a 500 μm , D corresponde a 200 μm , E y F corresponde a 100 μm .

Fig. 8

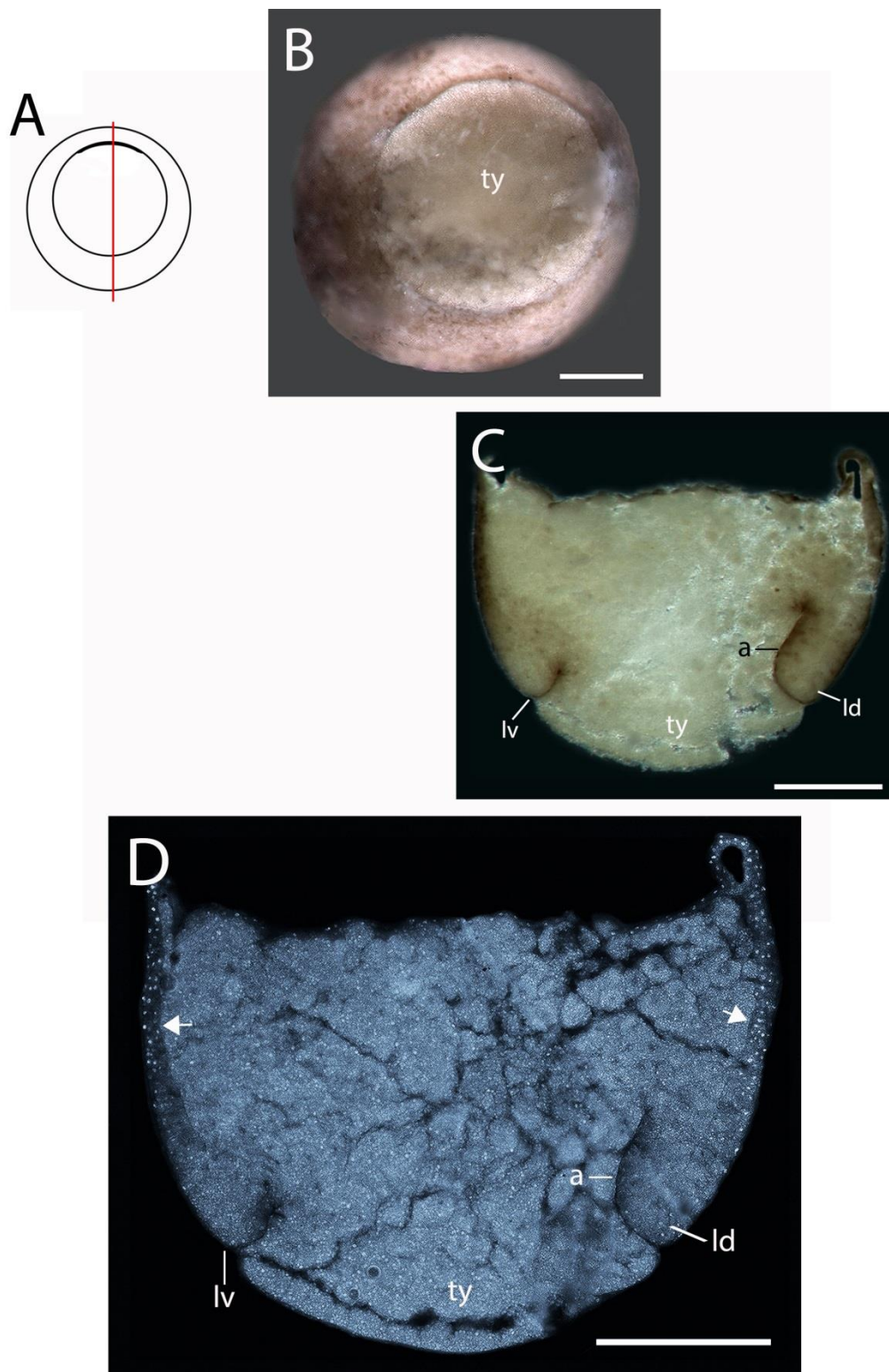


Figura 8. Morfología de la gástrula media de *H. vertebralis* (estadio 11): En A y B el lado dorsal está orientado hacia arriba. En C y D el hemisferio animal está orientado hacia arriba. (A) Esquema de la vista vegetal externa de un embrión de estadio 11. La línea roja indica el plano de corte de las secciones sagitales que se muestran en las imágenes C y D. (B) Vista vegetal externa. Se observa la expansión lateral y ventral del labio dorsal del blastoporo. (C) Sección sagital. Se observa el labio dorsal del blastoporo orientado hacia la derecha y el labio ventral a la izquierda. Nótese la pigmentación en el labio dorsal y ventral del blastoporo. El arquenterón se observa a la derecha. El techo del blastocele ha colapsado como resultado de un artefacto de la fijación. (D) Fluorescencia nuclear de la sección sagital en C. Se observa el labio dorsal del blastoporo orientado hacia la derecha y el labio ventral a la izquierda. Las flechas indican el cleft de Brachet. Las barras en B, C y D corresponden a 500 μm .

Figura 9.

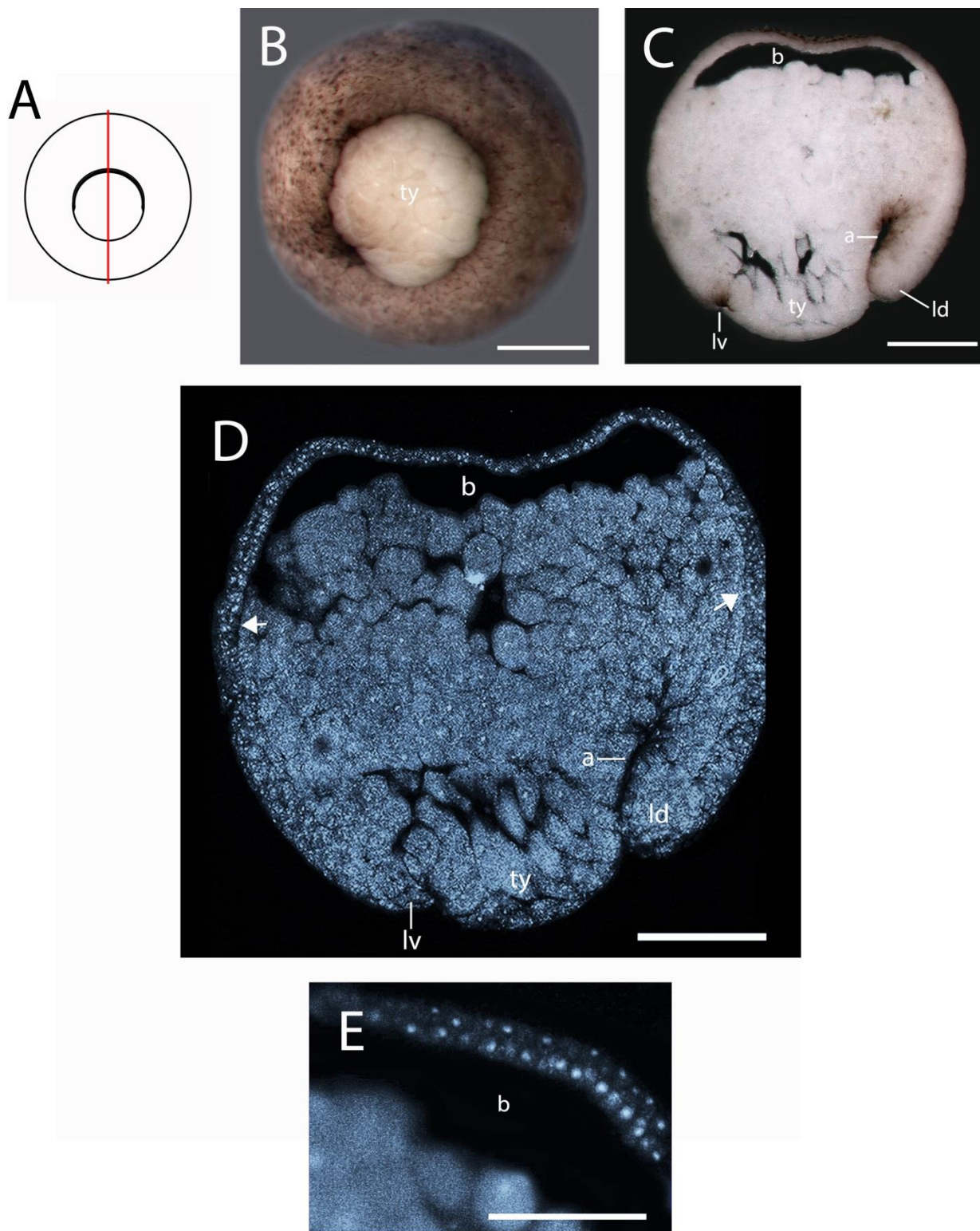


Figura 9. Morfología de la gástrula tardía de *H. vertebralis* (estadio 12): En A y B el lado dorsal está orientado hacia arriba. (A) Esquema de la vista posterior externa de un embrión de estadio 12. La línea roja indica el plano de corte de las secciones sagitales que se muestran en las imágenes C-E. (B) Vista posterior externa. Se observa la reducción en el tamaño del tapón de yema. (C) Sección sagital. Se observa el labio dorsal del blastoporo a la derecha y el labio ventral a la izquierda. Nótese la pigmentación en el labio dorsal y ventral del blastoporo. El arquenterón se observa a la derecha. El colapso del techo del blastocele es un artefacto de la fijación. (D) Fluorescencia nuclear de una sección sagital. Se observa el labio dorsal del blastoporo a la derecha y el labio ventral a la izquierda. Las flechas indican el cleft de Brachet. (E) Acercamiento del techo del blastocele. Se observa que el techo del blastocele está formado por dos capas de células. Las barras en B y C corresponden a 500 μm , en D corresponde a 200 μm y en E corresponde a 100 μm .

Figura 10.

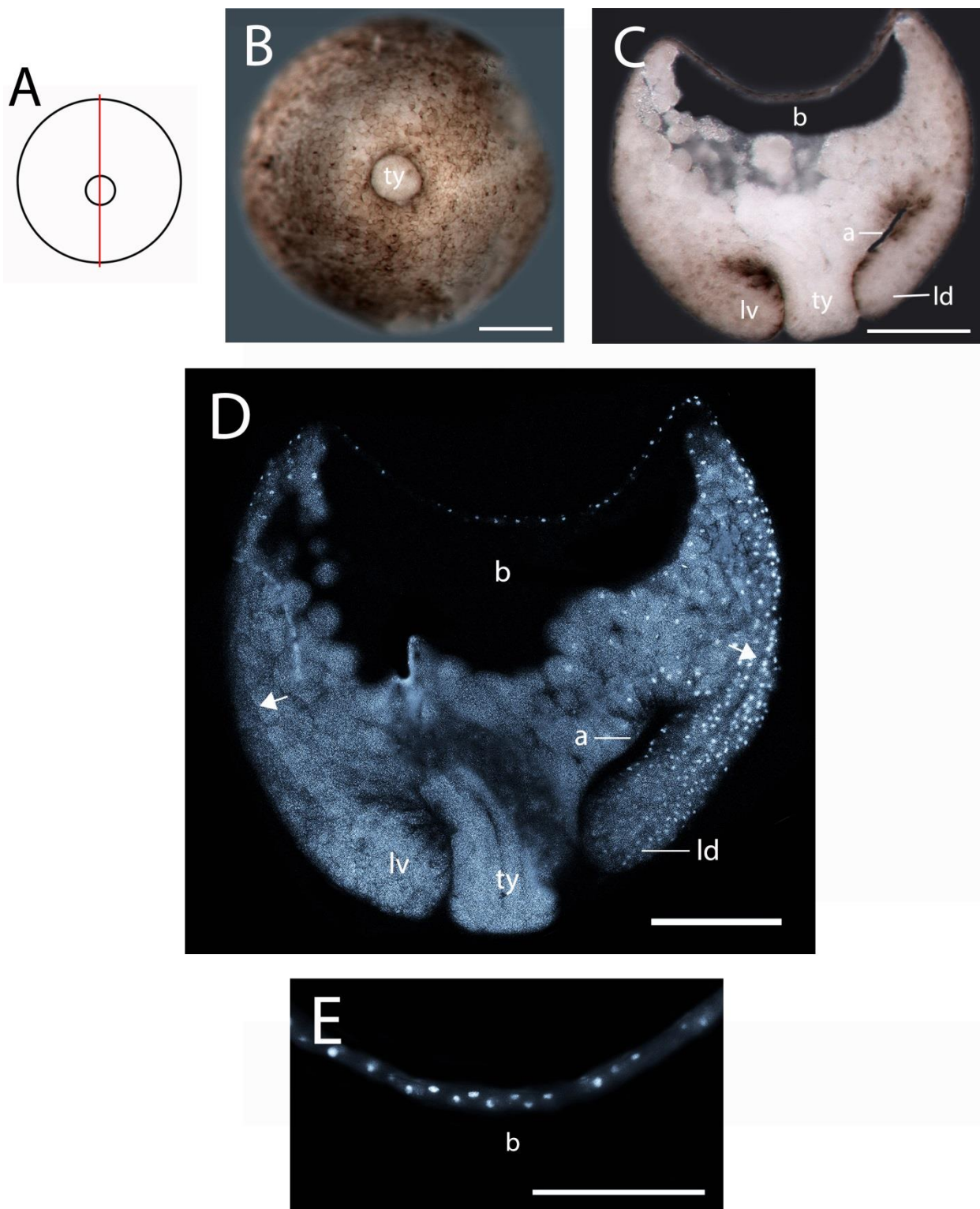


Figura 10. Morfología de la gástrula tardía de *H. vertebralis* (estadio 12.5): (A) Esquema de la vista posterior externa de un embrión de estadio 12.5. La línea roja indica el plano de corte de las secciones sagitales que se muestran en las imágenes C-E. (B) Vista posterior externa. Se observa la reducción en el tamaño del tapón de yema. (C) Sección sagital. Se observa el labio dorsal del blastoporo a la derecha y el labio ventral a la izquierda. Nótese la pigmentación en el labio dorsal y ventral del blastoporo. Se observa aumento en la extensión del arquenterón. El colapso del techo del blastocele es un artefacto de la fijación. (D) Fluorescencia nuclear de la sección sagital en C. Las flechas indican el cleft de Brachet. (E) Acercamiento del techo del blastocele. Se observa que el techo del blastocele está formado por una capa de células. Las barras en B y C corresponden a 500 μm , en D corresponde a 200 μm y en E corresponde a 100 μm .

Figura 11.

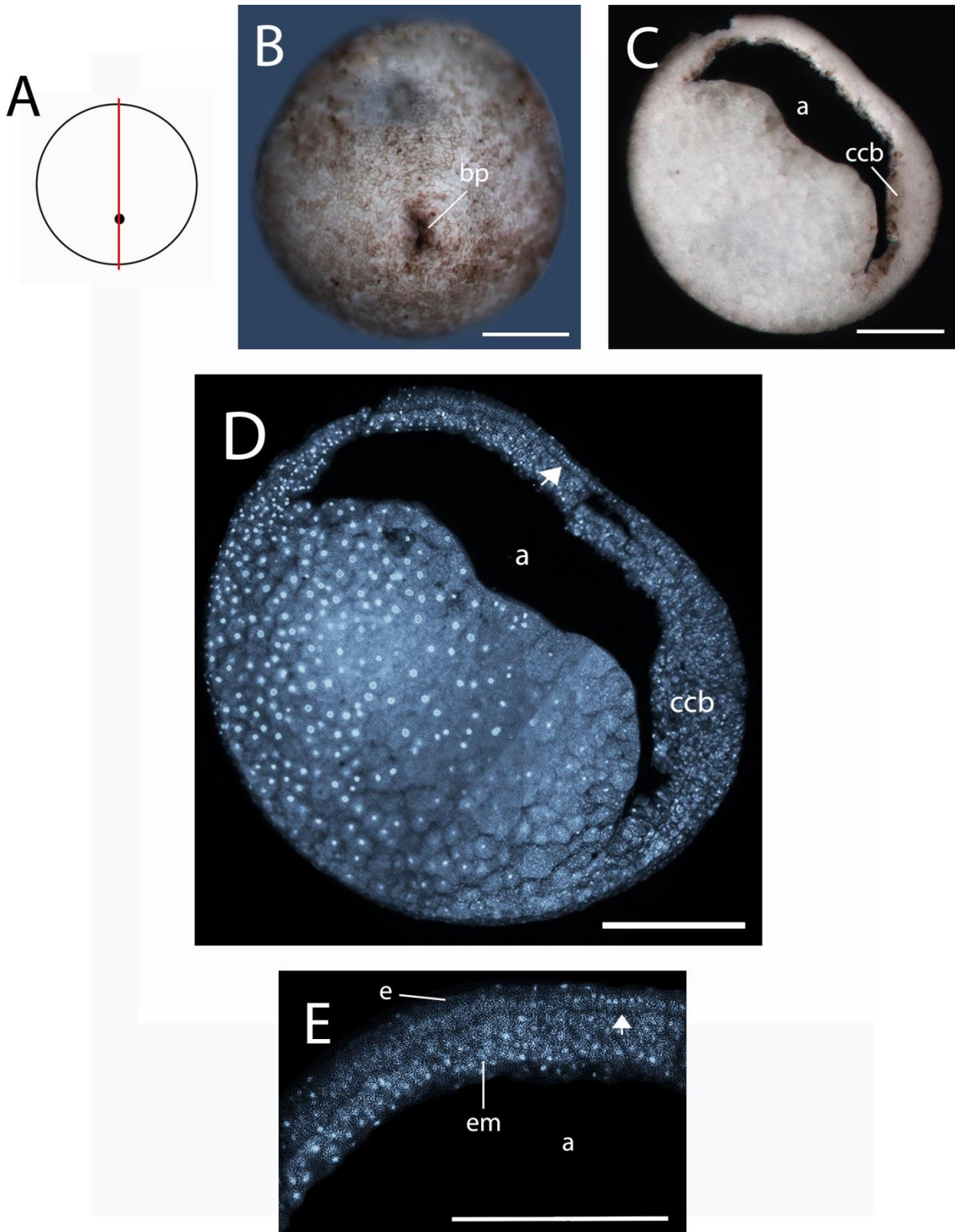


Figura 11. Morfología de la post-gástrula de *H. vertebralis* (estadio 13): En A y B la región dorsal está orientada hacia arriba. (A) Esquema de la vista posterior externa de un embrión de estadio 13. La línea roja indica el plano de corte de las secciones sagitales que se muestran en las imágenes C-E. (B) Vista posterior externa. Se observa al blastoporo cerrado. (C) Sección sagital. Se observa el collar circumblastoporal a la derecha. Se observa aumento en la extensión del arquenterón. (D) Fluorescencia nuclear de la sección sagital en C. Se observa el collar circumblastoporal a la derecha. La flecha indica el cleft de Brachet. (E) Acercamiento del techo del arquenteron. Se observa el posible ectodermo y el posible endomesodermo. La flecha indica el cleft de Brachet. Las barras en B y C corresponden a 500 μm y en D corresponde a 200 μm .

Figura 12.

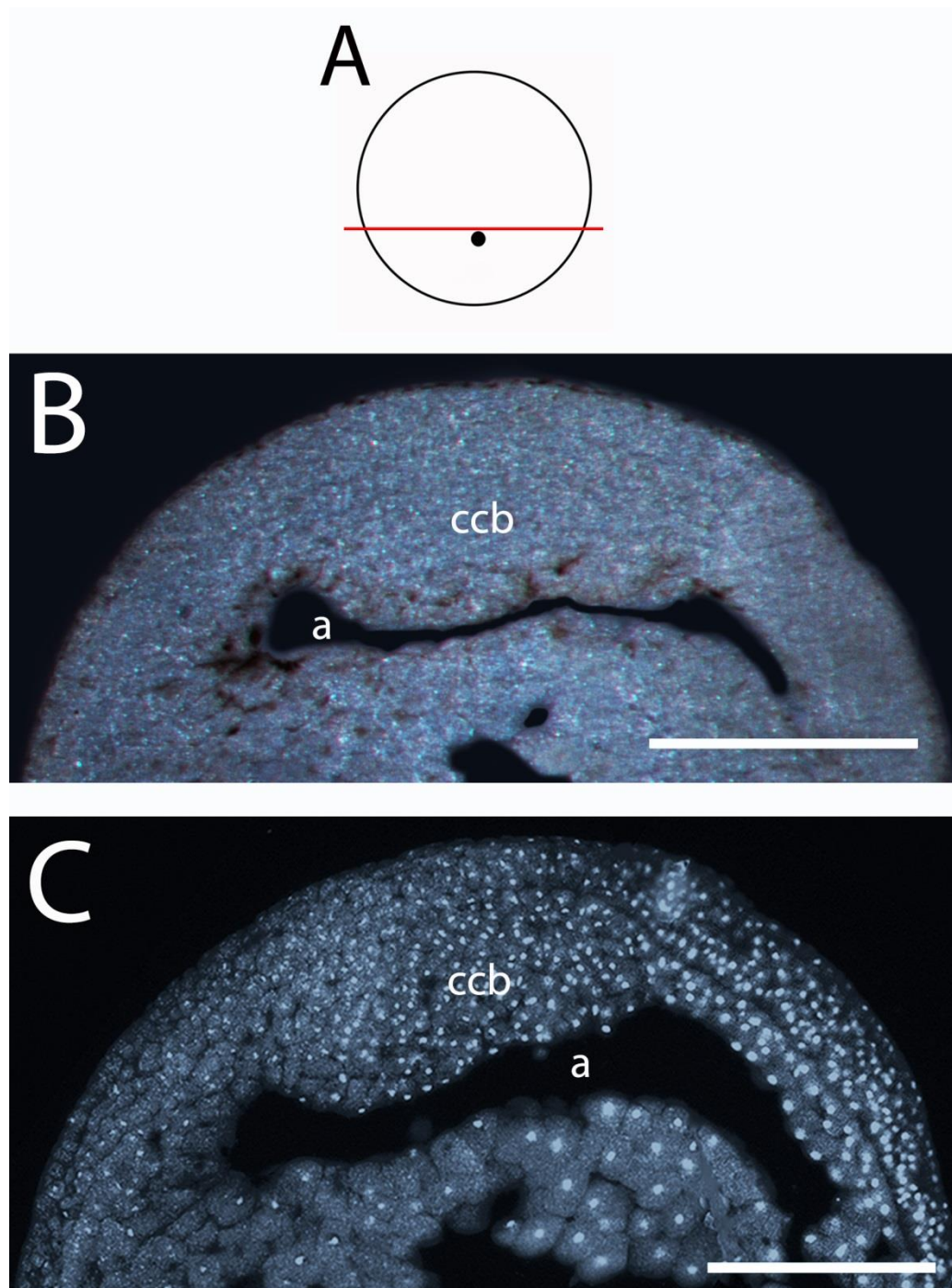


Figura 12. Secciones transversales de embriones en estadio de post-gástrula de *H. vertebralis* (estadio 13): (A) Esquema de la vista posterior externa de un embrión de estadio 13. La línea roja indica el plano de corte de las secciones transversales que se muestran en las imágenes B y C. (B) Sección transversal caudal. Se observa el collar circumblastoporal. (C) Fluorescencia nuclear de otra sección transversal de un embrión de estadio 13. Se observa el gran número de pequeñas células del collar circumblastoporal en comparación con las células vegetales. La barra en B corresponde a 500 μm y en C corresponde a 200 μm .

Figura 13.

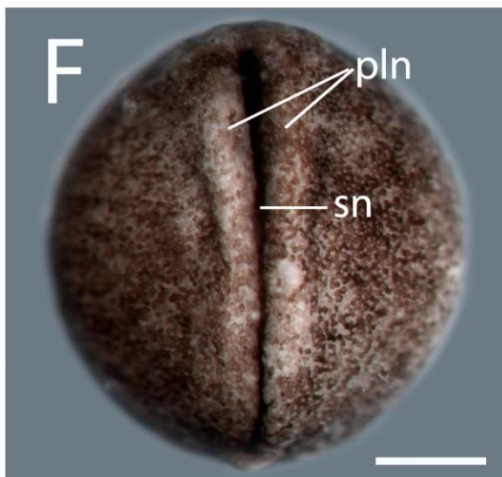
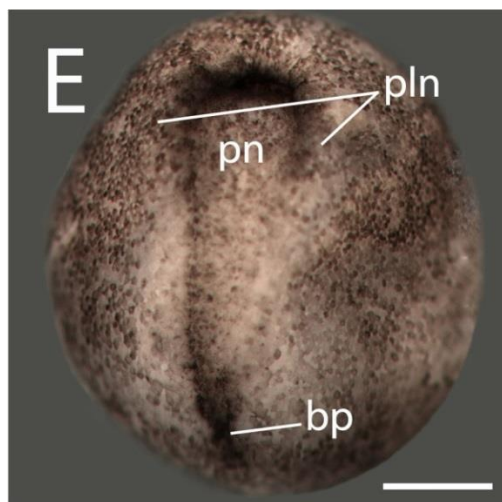
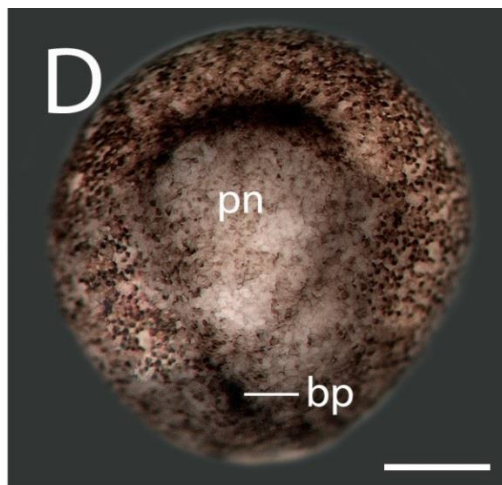
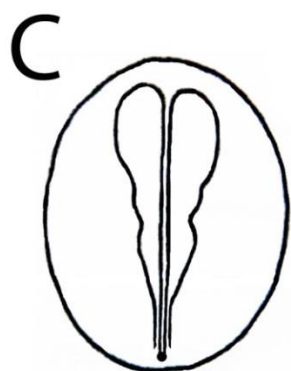
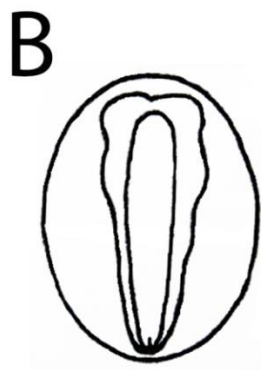
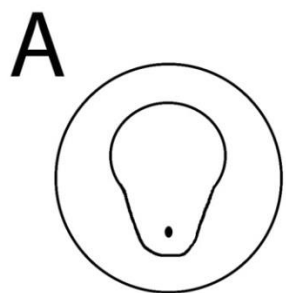


Figura 13. Morfología externa de la néurula de *H. vertebralis* (estadios 13.5, 14 y 15):

En todas las imágenes la región rostral está orientada hacia arriba. (A) Esquema de la vista dorsal de un embrión de estadio 13.5. (B) Esquema de la vista dorsal de un embrión de estadio 14. (C) Esquema de la vista dorsal de un embrión de estadio 15. (D) Néurula temprana. Vista dorsal. Se observa la placa neural y el blastoporo. (E) Néurula temprana. Vista dorsal. Se observa la placa neural, los pliegues neurales y el blastoporo. (F) Néurula media. Vista dorsal. Se observan los pliegues neurales y el surco neural. Las barras en D, E y F corresponden a 500 μm .

Figura 14.

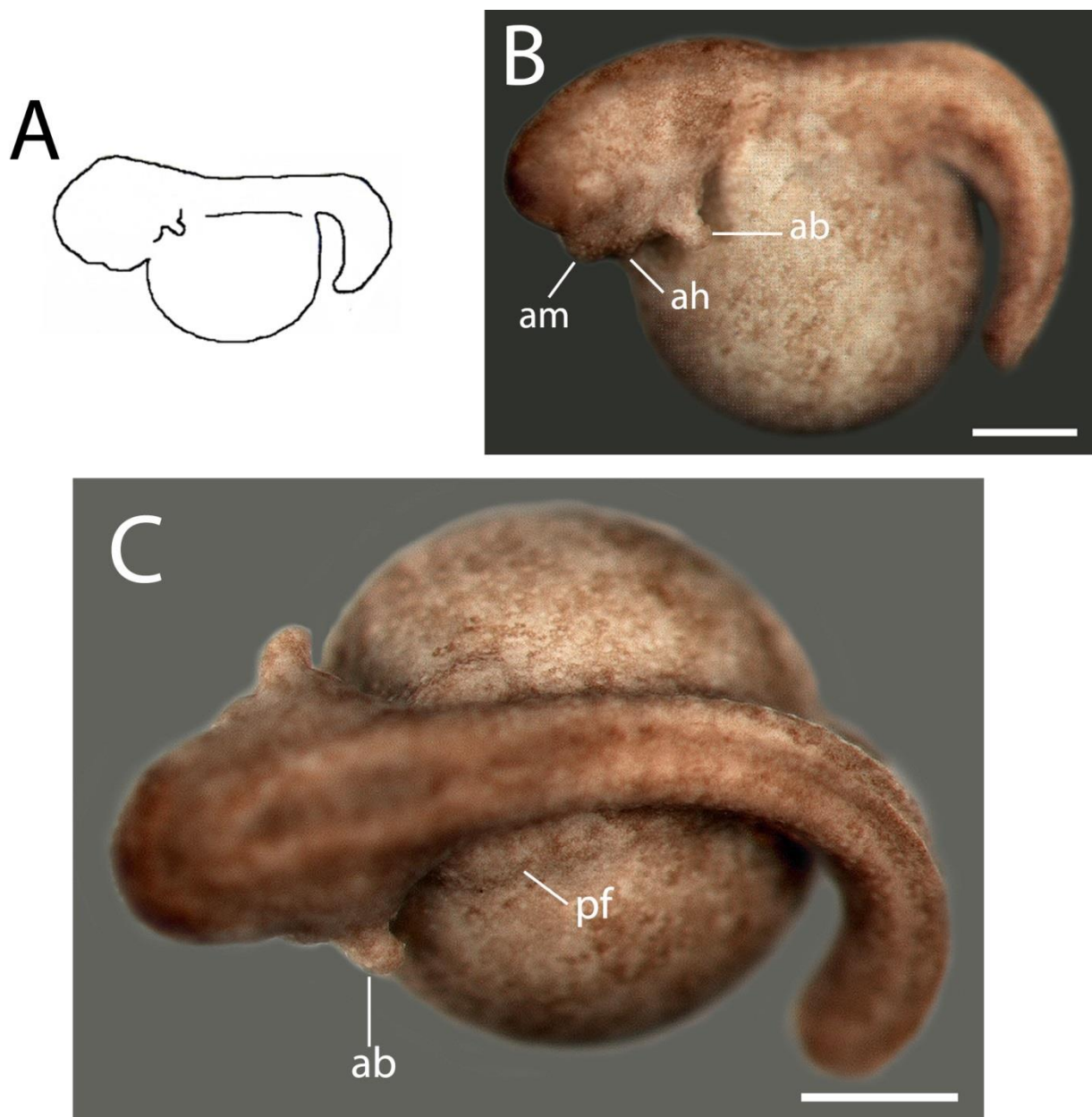


Figura 14. Morfología externa del estadio de arcos branquiales de *H. vertebralis* (estadio 18.5): En todas las imágenes la región rostral está orientada hacia la izquierda. (A) Esquema de la vista lateral de un embrión de estadio 18.5. (B) Vista lateral. Se observa el arco mandibular, el arco hioideo y el arco branquial. (C) Vista dorsal. Se observan el arco branquial y el pronefros. Las barras en B y C corresponden a 500 μm .

Figura 15.

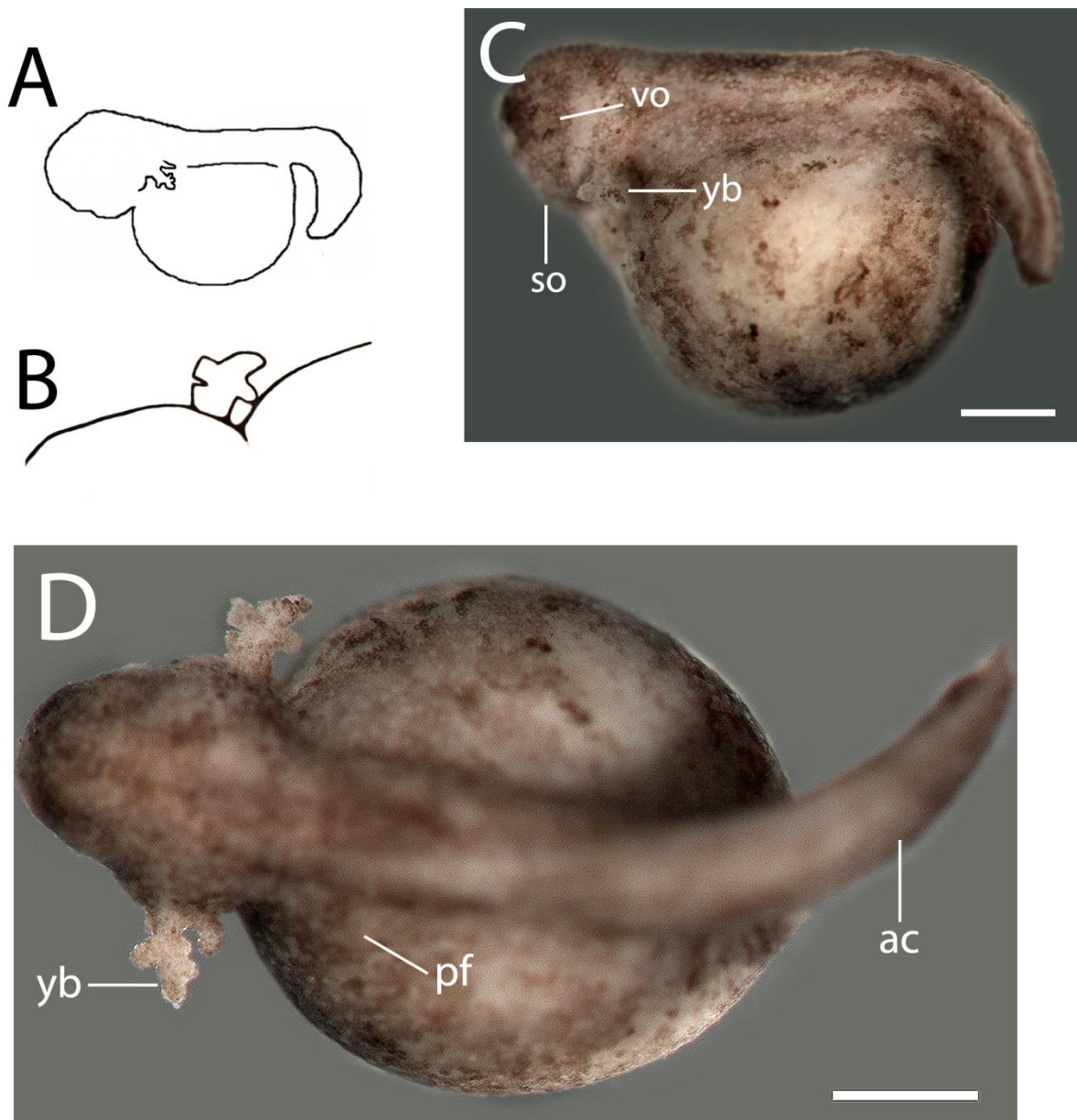


Figura 15. Morfología externa del estadio de yema de las branquias de *H. vertebralis* (estadio 19): En todas las imágenes la región rostral está orientada hacia la izquierda. (A) Esquema de la vista lateral de un embrión de estadio 19. (B) Esquema de las yemas de las branquias de un embrión de estadio 19. La yema del primer par de branquias posee tres ramificaciones pequeñas ramificaciones. La yema del segundo par de branquias es visible. (C) Embrión entero en estadio de yema de las branquias. Vista lateral. Se observa la vesícula óptica, la yema de las branquias y el estomodeo. (D) Embrión entero en estadio de yema de las branquias. Vista dorsal. Se observan las primeras ramificaciones de la yema de la branquia anterior. Además, se observa el arco branquial posterior, el pronefros y la aleta caudal. Las barras en B y C corresponden a 500 μm .

Figura 16.

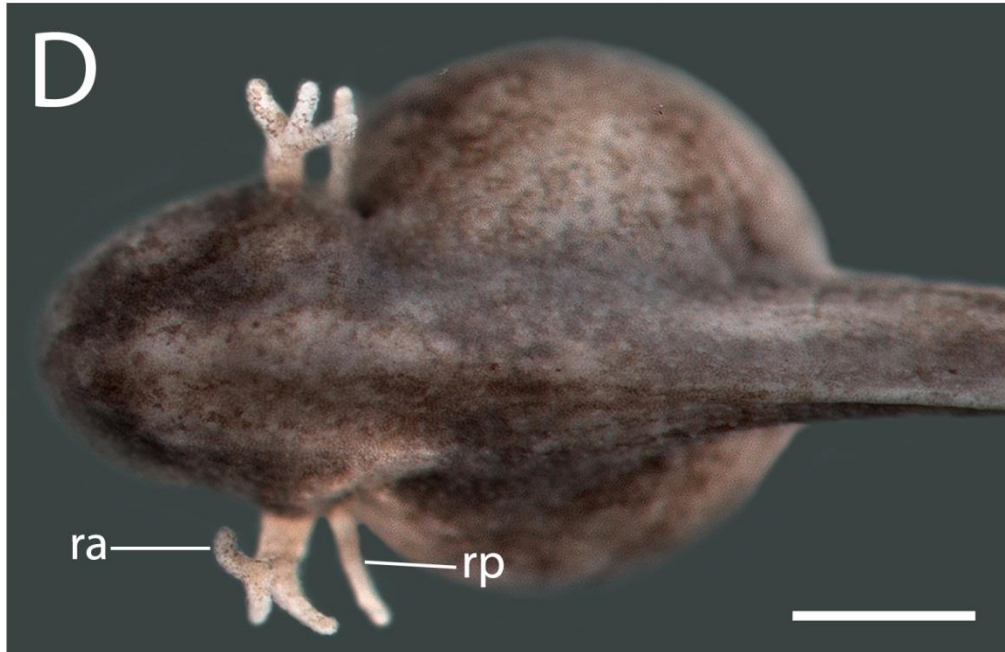
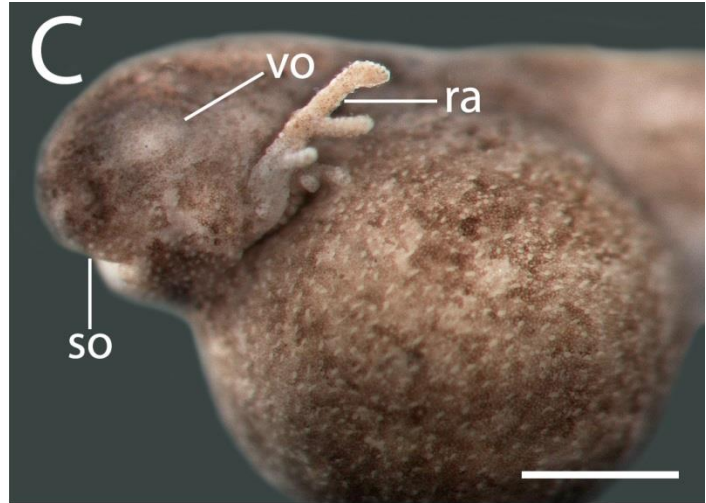
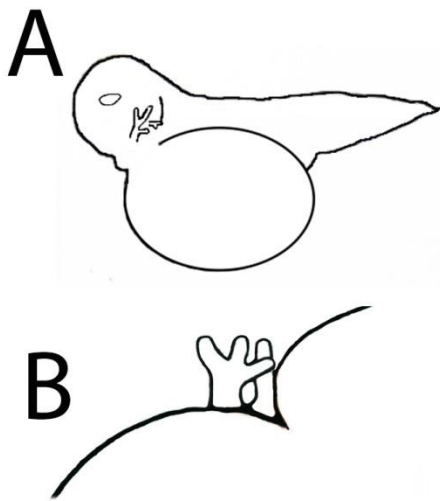


Figura 16. Morfología externa en el estadio del desarrollo de las branquias de *H. vertebralis* (estadio 20): En todas las imágenes la región rostral está orientada hacia la izquierda. (A) Esquema de la vista lateral de un embrión de estadio 20. (B) Esquema de las branquias de un embrión de estadio 20. La rama anterior de las branquias posee tres ramificaciones. La rama posterior es visible. (C) Magnificación de la cabeza de un embrión en estadio de desarrollo de las branquias. Vista lateral. Se observa la vesícula óptica, la rama anterior de las branquias y el estomodeo. (D) Embrión en estadio de desarrollo de las branquias. Vista dorsal. Se observan las tres ramificaciones de la rama anterior de las branquias. La rama posterior es visible. Las barras en C y D corresponden a 500 μm .

Figura 17.

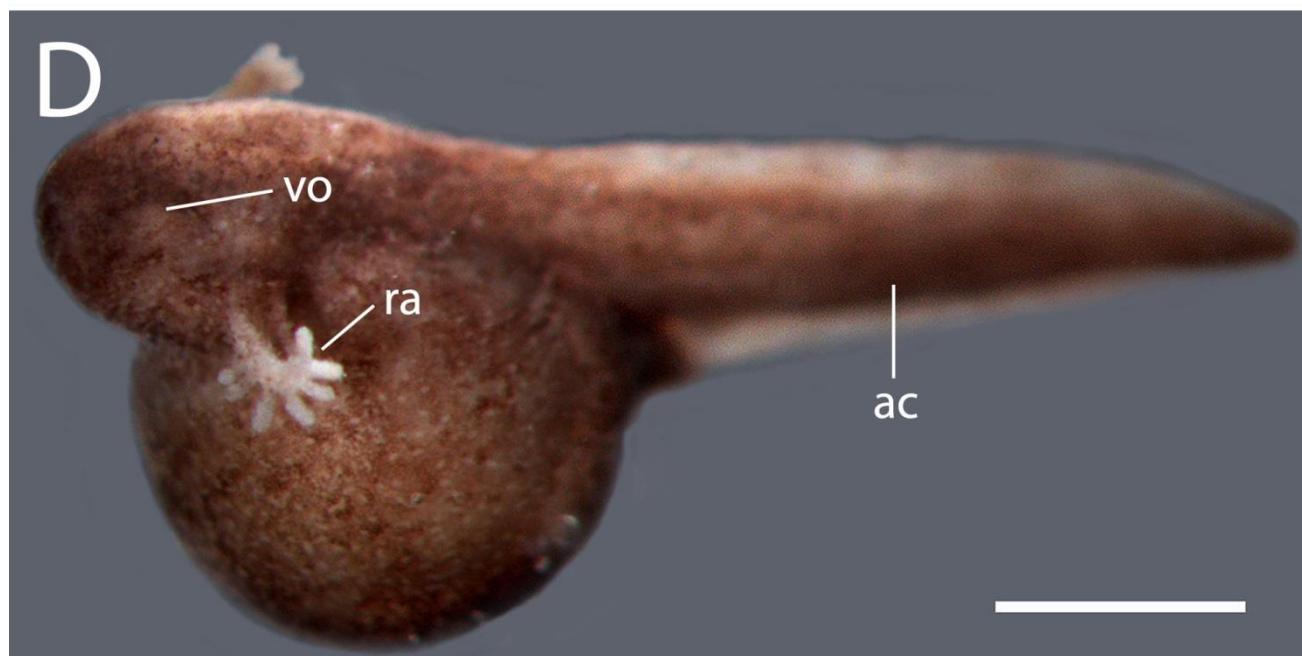
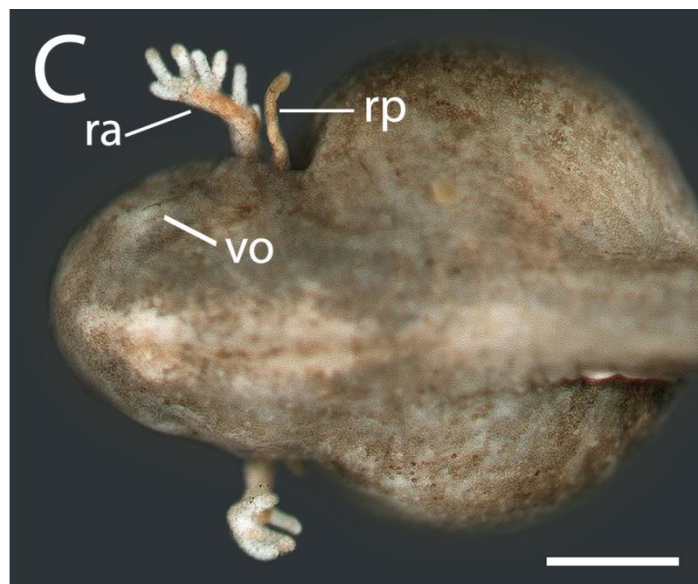
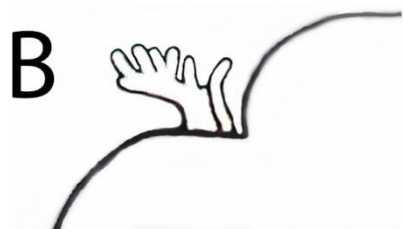
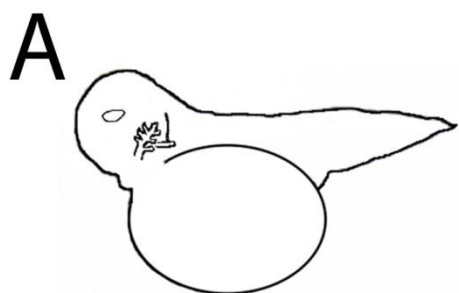


Figura 17. Morfología externa en el estadio de branquias en desarrollo de *H. vertebralis* (estadio 21): En todas las imágenes la región rostral está orientada hacia la izquierda. (A) Esquema de la vista lateral de un embrión de estadio 21. (B) Esquema de las branquias de un embrión de estadio 21. La rama anterior de las branquias posee siete ramificaciones. Se observa alargada a la rama posterior. (C) Magnificación de la cabeza de un embrión en estadio de desarrollo de las branquias. Vista dorsal. Se observan las siete ramificaciones de la rama anterior de las branquias. Además, se observan las vesículas ópticas y la rama posterior de las branquias. (D) Embrión entero en estadio de desarrollo de las branquias. Vista lateral. Se observa la rama anterior de las branquias, la vesícula óptica y la aleta caudal. La barra en C corresponde a 500 μm y en D corresponde a 1 mm.

Figura 18.

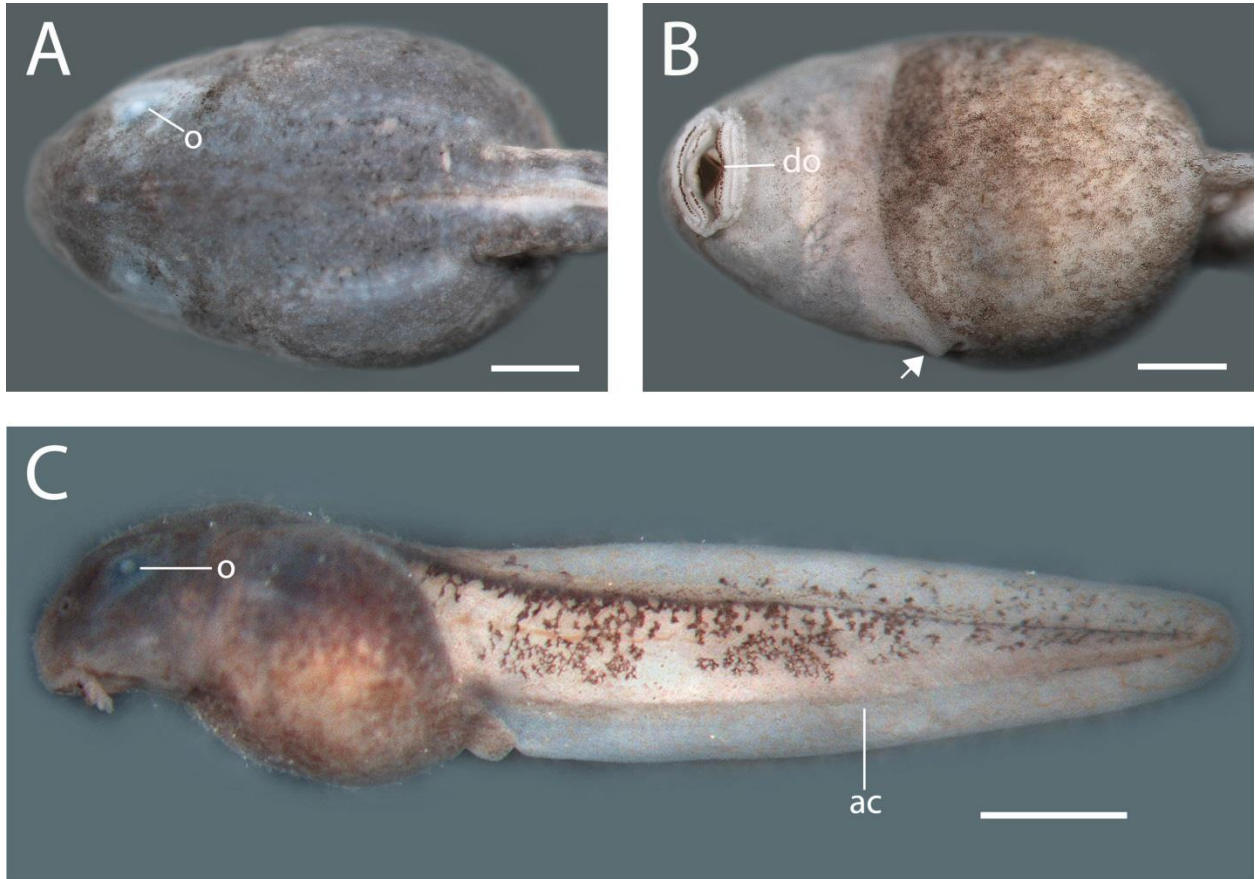


Figura 18. Morfología externa de un embrión a eclosionar de *H. vertebralis* (estadio 25): En todas las imágenes la región rostral está orientada hacia la izquierda. (A) Magnificación de la cabeza de un embrión a eclosionar. Vista dorsal. Se observan los ojos completamente formados. (B) Magnificación de la cabeza de un embrión a eclosionar. Vista ventral. Se observa el disco oral con dientes pigmentados. La flecha indica el espiráculo. (C) Embrión entero en estadio a eclosionar. Vista lateral. Se observa el ojo y la aleta caudal. El cuerpo presenta pigmentación. Las barras en A y B corresponden a 500 μm y en C corresponde a 1mm.

9. TABLAS

Tabla 1. Lista de fotografías, magnificación y créditos

Figura	Negativo	Iluminación	Magnificación	Fecha	Crédito
1A	SNAP-155145-0017	Luz directa	3.2x	23/05/2012	K. Torres
1B	SNAP-163044-0007	Luz directa	2.5x	11/11/2009	K. Torres
1C	SNAP-120021-0021	Luz directa	3.2x	20/12/2012	K. Torres
1D	SNAP-144946-0008	Luz directa	2.5x	26/11/2012	K. Torres
1E	SNAP-164611-0006	Luz directa	3.2x	26/01/2011	K. Torres
1F	SNAP-102114-0002	Luz directa	3.2x	01/02/2011	K. Torres
1G	SNAP-145450-0011	Luz directa	3.2x	29/10/2012	K. Torres
1H	SNAP-082250-0006	Luz directa	2.5x	10/05/2010	K. Torres
1I	SNAP-122140-0020	Luz directa	3.2x	28/08/2013	K. Torres
1J	SNAP-104126-0009	Luz directa	2.5x	02/01/2014	K. Torres
1K	SNAP-094137-0018	Luz directa	3.2x	18/03/2010	K. Torres
1L	SNAP-151731-0004	Luz directa	2.5x	02/01/2014	K. Torres
1M	SNAP-110917-0016	Luz directa	2.5x	11/02/2011	K. Torres
1N	SNAP-095923-0014	Luz directa	2.5x	02/01/2014	K. Torres
1O	SNAP-154420-0005	Luz directa	1.6x	05/02/2014	K. Torres
1P	SNAP-142659-0002	Luz directa	1x	10/01/2014	K. Torres
2B	SNAP-155145-0017	Luz directa	3.2x	23/05/2012	K. Torres
2C	SNAP-154106-0014	Luz directa	3.2x	23/05/2012	K. Torres
2D	SNAP-152901-0001	Luz directa	3.2x	23/05/2012	K. Torres
3B	SNAP-111639-0019	Luz directa	3.2x	17/05/2011	K. Torres
3C	SNAP-110656-0007	Luz directa	3.2x	17/05/2011	K. Torres
3D	SNAP-111329-0010	Luz directa	3.2x	17/05/2011	K. Torres
4B	SNAP-163044-0007	Luz directa	2.5x	11/11/2009	K. Torres
4C	SNAP-164933-0005	Luz directa	3.2x	29/09/2009	K. Torres
4D	SNAP-161559-0011	Luz directa	3.2x	16/09/2009	K. Torres
5B	SNAP-120021-0021	Luz directa	3.2x	20/12/2012	K. Torres
5C	SNAP-115735-0019	Luz directa	3.2x	20/12/2012	K. Torres
5D	SNAP-120341-0025	Luz directa	3.2x	20/12/2012	K. Torres
6B	SNAP-144946-0008	Luz directa	2.5x	26/11/2012	K. Torres
6C	SNAP-145558-0015	Luz directa	2.5x	26/11/2012	K. Torres
6D	SNAP-125527-0008	Luz directa	3.2x	17/12/2012	K. Torres
7B	SNAP-164611-0006	Luz directa	3.2x	26/01/2011	K. Torres
7C	SNAP-152041-0040	Luz directa	3.2x	02/10/2012	K. Torres
7D	SNAP-105101-0016	Fluorescencia	5x	04/06/2013	K. Torres
	SNAP-105221-0017	Fluorescencia	5x	04/06/2013	K. Torres
	SNAP-105344-0018	Fluorescencia	5x	04/06/2013	K. Torres
7E	SNAP-105101-0016	Fluorescencia	5x	04/06/2013	K. Torres
7F	SNAP-122023-0031	Fluorescencia	10x	14/06/2013	K. Torres

8B	SNAP-102114-0002	Luz directa	3.2x	01/02/2011	K. Torres
8C	SNAP-162049-0013	Luz directa	4x	05/09/2012	K. Torres
8D	SNAP-155648-0002	Fluorescencia	5x	18/02/2014	K. Torres
	SNAP-155715-0003	Fluorescencia	5x	18/02/2014	K. Torres
	SNAP-160710-0012	Fluorescencia	5x	18/02/2014	K. Torres
9B	SNAP-145450-0011	Luz directa	3.2x	29/10/2012	K. Torres
9C	SNAP-154410-0005	Luz directa	3.2x	07/11/2012	K. Torres
9D	SNAP-103622-0007	Fluorescencia	5x	04/06/2013	K. Torres
	SNAP-103749-0009	Fluorescencia	5x	04/06/2013	K. Torres
9E	SNAP-104533-0014	Fluorescencia	10x	04/06/2013	K. Torres
10B	SNAP-082250-0006	Luz directa	2.5x	10/05/2010	K. Torres
10C	SNAP-145556-0012	Luz directa	4x	05/10/2012	K. Torres
10D	SNAP-163009-0025	Fluorescencia	5x	18/02/2014	K. Torres
	SNAP-163042-0026	Fluorescencia	5x	18/02/2014	K. Torres
	SNAP-163111-0027	Fluorescencia	5x	18/02/2014	K. Torres
	SNAP-163131-0028	Fluorescencia	5x	18/02/2014	K. Torres
10E	SNAP-162317-0023	Fluorescencia	10x	18/02/2014	K. Torres
11B	SNAP-122140-0020	Luz directa	3.2x	28/08/2013	K. Torres
11C	SNAP-110345-0003	Luz directa	3.2x	30/08/2013	K. Torres
11D	SNAP-145736-0004	Fluorescencia	5x	09/09/2013	K. Torres
	SNAP-150213-0006	Fluorescencia	5x	09/09/2013	K. Torres
11E	SNAP-150213-0006	Fluorescencia	5x	09/09/2013	K. Torres
12B	SNAP-155437-0007	Luz directa	4x	05/02/2014	K. Torres
12C	SNAP-170436-0035	Fluorescencia	5x	09/10/2013	K. Torres
	SNAP-171017-0045	Fluorescencia	5x	09/10/2013	K. Torres
13D	SNAP-104126-0009	Luz directa	2.5x	02/01/2014	K. Torres
13E	SNAP-094137-0018	Luz directa	3.2x	18/03/2010	K. Torres
13F	SNAP-151731-0004	Luz directa	2.5x	02/01/2014	K. Torres
14B	SNAP-105429-0001	Luz directa	2.5x	15/03/2010	K. Torres
14C	SNAP-110917-0016	Luz directa	2.5x	11/02/2011	K. Torres
15C	SNAP-094926-0007	Luz directa	2.5x	02/01/2014	K. Torres
15D	SNAP-095923-0014	Luz directa	2.5x	02/01/2014	K. Torres
16C	SNAP-105130-0008	Luz directa	3.2x	19/03/2010	K. Torres
16D	SNAP-164416-0015	Luz directa	2.5x	23/03/2010	K. Torres
17C	SNAP-112017-0010	Luz directa	2.5x	24/03/2010	K. Torres
17D	SNAP-154420-0005	Luz directa	1.6x	05/02/2014	K. Torres
18A	SNAP-113219-0016	Luz directa	2.5x	29/03/2010	K. Torres
18B	SNAP-113411-0019	Luz directa	2.5x	29/03/2010	K. Torres
18C	SNAP-142659-0002	Luz directa	1x	10/01/2014	K. Torres

Tabla 2. Número de embriones por postura de *H. vertebralis*

No Postura		No embriones por postura
Hv-001		19
Hv-002		17
Hv-003		18
Hv-004		15
Hv-005		14
Hv-007		15
Hv-008		13
Hv-009		20
Hv-010		16
Hv-011		12
Hv-012		18
Hv-029		17
Hv-031		19
Hv-033		17
	Promedio	16,5

Tabla 3. Estadios del desarrollo de *H. vertebralis* en relación a la tabla de desarrollo de *X. laevis* (Niewkoop y Faber, 1994) y la tabla general de anfibios de Gosner (1960)

Estadios <i>H. vertebralis</i>	Estadios <i>X. laevis</i>	Estadios Gosner	Características de los embriones de <i>H. vertebralis</i>
2	2	3	Estadio de 2 células
3	3	4	Estadio de 4 células
4	4	5	Estadio de 8 células
5	5	6	Estadio de 16 células
9	9	9	Blástula avanzada
10	10	10	Gástrula temprana. Formación del labio dorsal, localizado en la zona subecuatorial. El blastocele se observó como una cavidad grande y su techo estaba conformado por varias capas celulares
11	11	10	Gástrula media con un tapón de yema que media alrededor de $\frac{1}{2}$ del diámetro del embrión. El arquenterón era pequeño
12	12	11	Gástrula tardía con un tapón de yema que fue $\frac{1}{3}$ del diámetro del embrión o más pequeño
13	13	13	Estadio de blastoporo en forma de ranura. Al interior, el arquenterón estaba alargado. Un gran collar circumblastoporal fue visible. En estadio 13 avanzado se observa la placa neural

14	14	14	Estadio de néurula temprana. Se observaron los pliegues neurales
15	16	15	Estadio de néurula media. Los pliegues neurales estaban elevados y próximos
16	20	16	Estadio de néurula tardía. El tubo neural estaba cerrado
18	26	18	Estadio de arcos branquiales. Los arcos branquiales sobresalían a cada lado de la cabeza
19	33	19	Estadio de yema de las branquias. Las yemas de las branquias presentaron 2 ramificaciones
20	40	20	Estadio de desarrollo de las branquias. Circulación en las branquias. El primer par de branquias se observaron con 3 ramificaciones
21	41	21	Estadio de branquias en desarrollo. El primer par de branquias externas se observaron con 7 ramificaciones. El segundo par de branquias externas era pequeño y sin ramificación
25	45	25	Estadio a eclosionar. Opérculo cubre por completo a las branquias. Los embriones tienen apariencia de renacuajo

Tabla 4. Tiempos del desarrollo, en horas y minutos, de los embriones *H. vertebralis* para cada postura.

Postura	Hv-001	Hv-025	Hv-029	Hv-031	Hv-033
Fecha inicio:	06/05/2009	03/05/2010	17/05/2011	25/06/2011	04/09/2011
Fecha eclosión:					13/09/2011
Estadio					
2			0:00		
3			1:17		
4			2:47		
5			4:17		
9			22:47		
10			33:47		
10.5	0:00	0:00			
11	4:30	1:00	41:07		
12		3:10	45:52		
12.5	23:00	21:25	48:09		
13			72:23		
13.5		27:05			
14		28:28			
15		30:00			
15.5	46:00				
16		47:07			
17		69:07		0:00	
18				21:00	
19				48:00	
20				93:00	0:00
21					23:00
22					46:30
23					70:00
24					118:00
25					192:00

Tabla 5. Edad promedio, en horas y días, de los estadios de desarrollo de *H. vertebralis*. La edad promedio fue determinada a partir de los datos de la Tabla 2.

St	<i>H. vertebralis</i>	
	Edad	
	Horas	Días
2	0:00	
3	1:17	
4	2:47	
5	4:17	
9	22:47	
10	33:47	1,39
11	42:04	1,75
12	49:22	2,05
12.5	60:58	2,52
13	72:23	3,01
13.5	75:43	3,14
14	77:06	3,21
15	78:36	3,27
16	95:43	3,98
17	117:43	4,89
18	138:43	5,77
19	165:43	6,89
20	210:43	8,77
21	233:43	9,73
22	257:03	10,71
23	281:33	11,72
24	329:33	13,72
25	427:33	17,81

Tabla 6. Tiempos de gastrulación, en horas y minutos, de los embriones de *H. vertebralis*. El tiempo 00:00 es el inicio de la gastrulación. El tiempo de gastrulación es el tiempo que tardan los embriones desde la formación del labio dorsal del blastoporo hasta el cierre del mismo.

	Estadio	<i>H. vertebralis</i>	
		Horas	Días
Inicio de la gastrulación	10	00:00	1,04
	11	8:17	1,60
	12	15:35	
	12.5	25:02	
Final de la gastrulación	13	38:46	
	Total:	38:46	1,60

Tabla 7. Modos de reproducción, diámetros de huevo y tiempos de gastrulación en varias especies de anuros. El tiempo de gastrulación es el tiempo que tardan los embriones desde la fecundación hasta el final de la gastrulación.

Especie	Modos de reproducción	Diámetros de huevo (mm)	Tiempos de gastrulación
<i>Engystomops randi</i> ¹	Nidos de espuma	1.1	5.75 horas
<i>Xenopus laevis</i> ²	Acuático	1.2	11 horas
<i>Epipedobates machalilla</i> ³	Nidos terrestres	1.6	2.7 días
<i>Epipedobates anthonyi</i> ⁴	Nidos terrestres	2	1.5 días
<i>Epedobates tricolor</i> ⁴	Nidos terrestres	2	1.5 días
<i>Hyloxalus vertebralis</i>	Nidos terrestres	2.6	1.6 días
<i>Ameerega bilinguis</i> ⁴	Nidos terrestres	3	2.3 días
<i>Dendrobates auratus</i> ⁴	Nidos terrestres	3.5	3 días
<i>Gastrotheca riobambae</i> ⁵	Incubación de embriones en marsupio	3	14 días

¹ Gosner, 1960

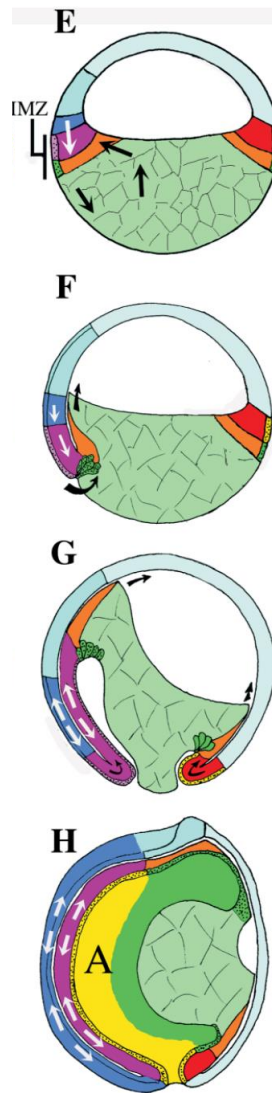
² Niewkoop y Faber, 1994

³ del Pino *et al.*, 2004

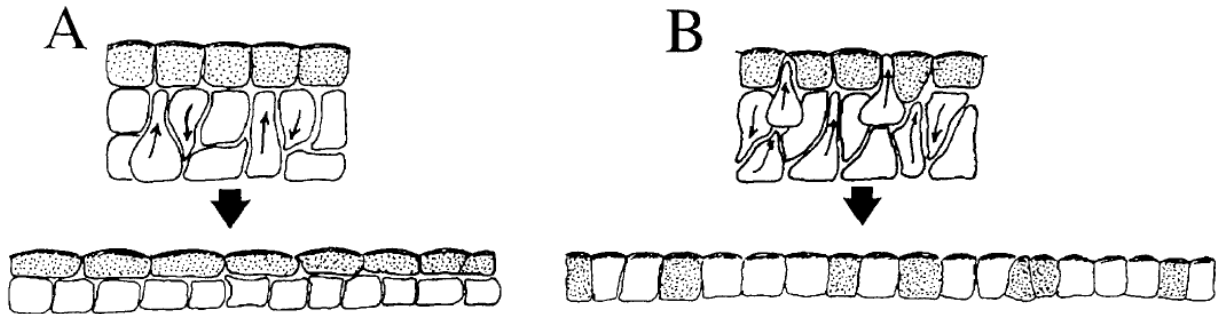
⁴ Montenegro, 2007

⁵ del Pino y Escobar, 1981

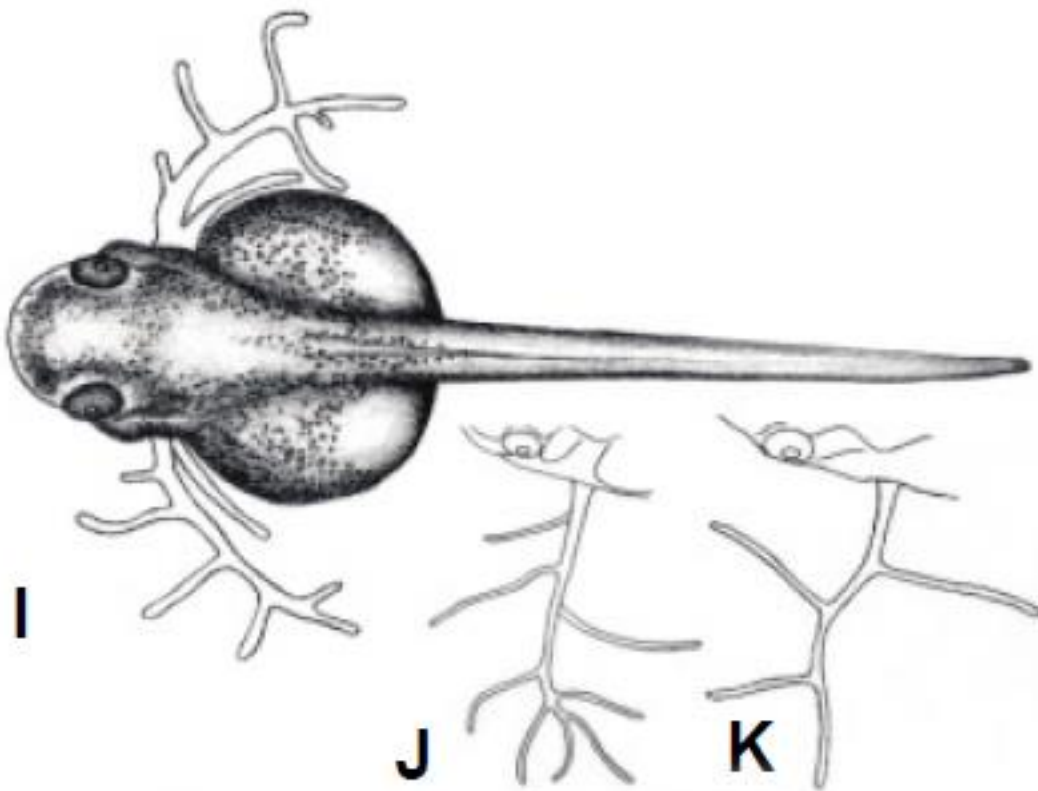
10. ANEXOS



Anexo 1. Diagrama de los movimientos de la gastrulación en *Xenopus*: (E) Inicio de la gastrulación: flechas indican la rotación vegetal. (F) Gástrula temprana: formación del labio dorsal del blastoporo debido a la invaginación de las células de botella. Flechas negras indican involución. (G) Gástrula media: flechas blancas indican movimientos de convergencia y extensión dorsales. El techo del blastocele sufre epíbole. (H) Gástrula tardía: el arquenterón alcanza su máximo tamaño. El blastoporo comienza a cerrarse (Tomado de Keller *et al.*, 2003).



Anexo 2. Movimiento de epíbole: (A) En *Xenopus*, este movimiento incluye la división y expansión de las células superficiales y la intercalación radial de las células profundas del techo del blastocele. (B) En urodelos, la intercalación radial se produce entre las células profundas y las superficiales (Tomado de Keller *et al.*, 2003).



Anexo 4. Estado de desarrollo completo de las branquias en varios dendrobátidos: (I)

En *E. machalilla*, el primer par de branquias tiene 6 ramificaciones. El segundo par de branquias es siempre pequeño y sin ramificaciones. (J) En *E. tricolor*, el primer par de branquias desarrolla un total de 8 ramificaciones. (K) En *C. marchesianus*, el primer par de branquias desarrolla solo 4 ramificaciones (Tomado de del Pino *et al.*, 2004).