

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Adaptaciones a la vida terrestre: análisis fisiológico y del desarrollo de branquias embrionarias en *Hyloxalus nexipus* e *Hyloxalus elachyhistus* (Dendrobatidae) y descripción del desarrollo embrionario de tres anuros con desarrollo directo: *Noblella* aff. *heyeri*, *Noblella* sp. (Craugastoridae) y *Osornophryne occidentalis* (Bufonidae).**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas**

**Santiago Leonardo Negrete Chuquimarca**

**Quito, 2018**

**A mi padre y hermana por acompañarme  
en este camino.**

## Agradecimientos

Dedico este trabajo principalmente a mi padre, por su amor incondicional y por ayudarme a cumplir mis sueños. A mi hermana, por estar en cada paso de mi vida, y enseñarme lo que el valor y la fuerza en realidad significan. A Vito, Kera y Tomas, por ser mi más grande inspiración.

Agradezco al Dr. Andrés Romero, por su dirección, apoyo y paciencia durante esta etapa, también por permitirme dar mis primeros pasos en el mundo de la ciencia dentro del laboratorio, sus consejos y apoyo serán valorados para siempre. A la Dra. Eugenia del Pino, su rectitud profesional y sus aportes a la biología serán siempre una fuente de admiración.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el convenio de ayuda económica del proyecto M13085 denominado: "Estudio comparativo del desarrollo de caracteres adaptativos en ranas de las familias Denrobatidae y Centrolenidae (Amphibia: Anura)", otorgado al Dr. Andrés Romero. Al museo de zoología Quito-Catolica sección herpetología (QCAZH) y a la iniciativa de conservación "Balsa de los sapos", por la colaboración con los especímenes donados.

Quiero agradecer al equipo del laboratorio, especialmente a Maria José Nicholls, por su apoyo, amabilidad y aprecio, su ayuda fue fundamental en esta investigación. A Franco Poma, por su ayuda y ánimo durante nuestra estancia en el laboratorio.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos y familia, los cuales han sido parte importante de mi carrera profesional y personal. A Fernando Torres, por su amistad incondicional y los grandes recuerdos, finalmente a Pauly Romero, por su amor, apoyo y por haberme permitido conocer el mundo de la biología a través de sus ojos.

## TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. HISTORIA NATURAL.....	6
3.2. MODOS REPRODUCTIVOS.....	7
3.2.1. DESARROLLO DIRECTO.....	8
3.2.2. BRANQUIAS EXTERNAS EMBRIONARIAS.....	9
3.3. HIPÓXIA EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO.....	12
3.4. OBJETIVOS.....	12
3.4.1. GENERAL.....	12
3.4.2. ESPECÍFICOS.....	13
4. METODOLOGÍA.....	14
4.1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS EMBRIONES.....	14
4.2. PROCESAMIENTO Y FIJACIÓN DE LOS EMBRIONES.....	14
4.2.1. SOLUCIONES Y FIJATIVOS.....	14
4.3. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE EMBRIONES CON DESARROLLO DIRECTO.....	16
4.4. EFECTOS DE LA HIPÓXIA EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO.....	16
4.5. EXTRACCIÓN MECÁNICA DE LAS YEMAS BRANQUIALES.....	17
4.6. ANALISIS DE IMÁGENES Y MORFOMETRÍA.....	18
5. RESULTADOS.....	20
5.1. EL DESARROLLO DIRECTO DE <i>Noblella</i> sp., <i>Noblella</i> aff. <i>heyeri</i> , <i>Osornophryne</i> <i>occidentalis</i> .....	20
5.1.1. DESARROLLO DE LOS EMBRIONES DE <i>Noblella</i> sp., <i>Noblella</i> aff. <i>heyeri</i> , <i>Osornophryne occidentalis</i> .....	20

5.1.2. MORFOLOGÍA EMBRIONARIA Y DESARROLLO DE <i>Noblella</i> sp., <i>Noblella</i> aff. <i>heyeri</i> y <i>Osornophryne occidentalis</i> .....	21
5.2. EXTRACCIÓN MECÁNICA DE LAS BRANQUIAS EXTERNAS Y EFECTOS DE LA HIPÓXIA EN EMBRIONES DE <i>Hyloxalus nexipus</i> .....	28
5.2.1. MORFOLOGÍA DE EMBRIONES DE <i>Hyloxalus nexipus</i> DURANTE EL DESARROLLO EN CONDICIONES HIPÓXICAS .....	29
5.2.2. SUPERVIVENCIA.....	31
5.2.3. FORMACIÓN DEL CRISTALINO .....	31
5.2.4. PRESENCIA DE EDEMAS.....	32
5.2.5. DESARROLLO DE LA ALETA CAUDAL .....	32
5.2.6. EXTRACCIÓN MECÁNICA DE LAS BRANQUIAS EXTERNAS Y EFECTOS DE LA HIPÓXIA EN <i>Hyloxalus elachyhistus</i> . .....	33
6. DISCUSIÓN.....	34
6.1. DESARROLLO DIRECTO .....	34
6.1.1. EL DESARROLLO TEMPRANO DE <i>Noblella</i> sp., <i>Noblella</i> aff. <i>heyeri</i> y <i>Osornophryne occidentalis</i> .....	34
6.1.2. EL DESARROLLO TARDÍO DE <i>Noblella</i> y <i>Osornophryne occidentalis</i> .....	37
6.1.3. <i>Noblella</i> aff. <i>heyeri</i> , <i>Noblella</i> sp. Y <i>Osornophryne occidentalis</i> EN RELACIÓN CON OTROS DESARROLLADORES DIRECTOS. ....	40
6.1.4. COBERTURA SECUNDARIA.....	41
6.1.5. PROGRESIÓN DE LAS EXTREMIDADES Y FORMACIÓN DE DIGITOS.....	42
6.1.6. DIENTE EMBRIONARIO .....	43
6.1.7. BRANQUIAS EXTERNAS .....	44
6.1.8. DESARROLLO DE LA COLA Y LA ALETA CAUDAL.....	44
6.2. HIPÓXIA EN EL DESARROLLO.....	45
6.3. LAS BRANQUIAS EXTERNAS DE <i>Hyloxalus nexipus</i> .....	47
7. CONCLUSIONES .....	51

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
9. FIGURAS.....	60
10. TABLAS.....	76
11. ANEXOS.....	78

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema del montaje de camaras experimentales.....	61
<b>Figura 2.</b> Series del desarrollo embrionario de <i>Noblella</i> aff. <i>heyeri</i> . ....	62
<b>Figura 3.</b> Series del desarrollo embrionario de <i>Noblella</i> sp. Estadios 5-9. ....	64
<b>Figura 4.</b> Series del desarrollo embrionario de <i>Noblella</i> sp. estadios 10 hasta eclosión.....	66
<b>Figura 5.</b> Series del desarrollo embrionario de <i>Osornophryne occidentalis</i> .....	69
<b>Figura 6.</b> Diferencias de las características morfológicas, supervivencia y formación de estructuras en embriones de <i>Hyloxalus nexipus</i> bajo diferentes condiciones de oxígeno. ....	71
<b>Figura 7.</b> Embriones de <i>Hyloxalus nexipus</i> en estadio 23, sometidos a diferentes condiciones de oxígeno. ....	72
<b>Figura 8.</b> Embriones de <i>Hyloxalus helachyhistus</i> en estadio 23, sometidos a diferentes condiciones de oxígeno.....	74

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Características morfológicas presentes durante el desarrollo de <i>Noblella aff. heyeri</i> , <i>Noblella sp.</i> , y <i>Osornophryne occidentalis</i> . .....	76
--	----

## Lista de anexos

<b>Anexo 1.</b> Mediciones morfológicas de individuos de <i>Hyloxalus nexipus</i> por experimento en el día inicial y el día final. ....	78
<b>Anexo 2.</b> Diferencia delta de las mediciones morfológicas de <i>Hyloxalus nexipus</i> en el día inicial y el día final de los individuos por tratamiento. Experimento (Exp), embriones (emb).....	82
<b>Anexo 2.1</b> Diferencia delta de las mediciones morfológicas de <i>Hyloxalus nexipus</i> en el día inicial y el día final de los individuos con branquias cortadas bajo normóxia (N). Experimento (Exp), embriones (emb).....	82
<b>Anexo 2.3</b> Diferencia delta de las mediciones morfológicas de <i>Hyloxalus nexipus</i> en el día inicial y el día final de los individuos con branquias cortadas bajo hipóxia severa (HS). Experimento (Exp), embriones (emb).....	84
<b>Anexo 2.4</b> Diferencia delta de las mediciones morfológicas de <i>Hyloxalus nexipus</i> en el día inicial y el día final de los individuos con branquias cortadas bajo normóxia (N). Experimento (Exp), embriones (emb).....	85
<b>Anexo 2.5</b> Diferencia delta de las mediciones morfológicas de <i>Hyloxalus nexipus</i> en el día inicial y el día final de los individuos con branquias cortadas bajo hipóxia leve (HL). Experimento (Exp), embriones (emb).....	86
<b>Anexo 2.6</b> Diferencia delta de las mediciones morfológicas de <i>Hyloxalus nexipus</i> en el día inicial y el día final de los individuos con branquias cortadas bajo hipóxia severa (HS). Experimento (Exp), embriones (emb).....	88
<b>Anexo 3.</b> Supervivencia de individuos de <i>Hyloxalus nexipus</i> por experimento. ....	90
<b>Anexo 4.</b> Proporción de individuos de <i>Hyloxalus nexipus</i> que formaron el cristalino por experimento. ....	91
<b>Anexo 5.</b> Proporción de individuos de <i>Hyloxalus nexipus</i> que formaron edema por experimento. ....	92
<b>Anexo 6.</b> Proporción de individuos de <i>Hyloxalus nexipus</i> que desarrollaron aleta por experimento. ....	93

<b>Anexo 7.</b> ANOVA del ancho de la yema de <i>Hyloxalus nexipus</i> y prueba de significación de Tukey.....	94
<b>Anexo 8.</b> ANOVA de la variación del ancho de la yema en el tiempo en <i>Hyloxalus nexipus</i> y prueba de significación de Tukey. ....	96
<b>Anexo 9.</b> ANOVA de la variación de la longitud total en el tiempo en <i>Hyloxalus nexipus</i> y prueba de significación de Tukey. ....	98
<b>Anexo 10.</b> ANOVA de la variación del ancho de la cola en el tiempo en <i>Hyloxalus nexipus</i> y prueba de significación de Tukey. ....	100
<b>Anexo 11.</b> ANOVA de la variación del ancho de la cabeza en el tiempo en <i>Hyloxalus nexipus</i> y prueba de significación de Tukey. ....	103
<b>Anexo 12.</b> ANOVA de la variación de la longitud tronco-cola en el tiempo en <i>Hyloxalus nexipus</i> y prueba de significación de Tukey.....	105
<b>Anexo 13.</b> ANOVA de la variación de la longitud de la branquia izquierda en el tiempo en <i>Hyloxalus nexipus</i> y prueba de significación de Tukey. ....	107
<b>Anexo 14.</b> ANOVA de la variación de la longitud de la branquia derecha en el tiempo en <i>Hyloxalus nexipus</i> y prueba de significación de Tukey. ....	109
<b>Anexo 15.</b> ANOVA de la proporción de supervivientes por tratamiento de <i>Hyloxalus nexipus</i> y prueba de significación de Tukey. ....	111
<b>Anexo 16.</b> ANOVA de la proporción de individuos que desarrollaron cristalino por tratamiento de <i>Hyloxalus nexipus</i> y prueba de significación de Tukey. ....	113
<b>Anexo 17.</b> ANOVA de la proporción de individuos que formaron edema por tratamiento de <i>Hyloxalus nexipus</i> y prueba de significación de Tukey. ....	116
<b>Anexo 18.</b> ANOVA de la proporción de individuos que desarrollaron aleta caudal por tratamiento de <i>Hyloxalus nexipus</i> y prueba de significación de Tukey. ....	118
<b>Anexo 19.</b> Identificación de nidos por experimentos. ....	121

## 1. RESUMEN

El presente estudio describe y analiza el desarrollo embrionario de varios anuros con dos modos reproductivos terrestres diferentes. *Noblella* aff. *heyeri*, *Noblella* sp. y *Osornophryne occidentalis* son tres especies cuyos embriones se desarrollan directamente. Por otro lado, *Hyloxalus nexipus* e *Hyloxalus elachyhistus*, son dos dendrobátidos con desarrollo embrionario terrestre bifásico, donde los huevos se desarrollan en tierra y posterior a la eclosión sus padres transportan los renacuajos hasta cuerpos de agua donde inicia la alimentación activa. En estas especies de dendrobátidos se estudió la fisiología y desarrollo de las branquias externas embrionarias para dilucidar su rol durante el desarrollo embrionario.

Los nidos de las dos especies de *Noblella* y *Osornophryne occidentalis* fueron incubados en laboratorio a 20°C y se documentó su desarrollo embrionario hasta la eclosión. Para identificar los estadios embrionarios se usó características como crecimiento y diferenciación de las extremidades, formación del diente embrionario, crecimiento y configuración de la cola, entre otros. En condiciones experimentales, los embriones de *O. occidentalis* se desarrollaron más lento que los embriones de *Noblella*, esto se pudo evidenciar en el crecimiento de las extremidades superiores. En comparación, otros eventos como la pigmentación del cuerpo y el crecimiento de las extremidades inferiores fueron similares en las tres especies, a pesar de sus diferentes tasas de desarrollo y anacronismo.

Los embriones de *Noblella* aff. *heyeri*, *Noblella* sp. y *Osornophryne occidentalis* carecen de branquias externas, similar a otras especies con desarrollo directo que no pertenecen a Eleutherodactylidae, Durante la progresión del desarrollo embrionario de estas tres especies se encontraron diversas variaciones morfológicas que, semejante a otros estudios, sugieren que el desarrollo directo ha evolucionado independientemente dentro de los anfibios.

*Hyloxalus nexipus* e *Hyloxalus elachyhistus*, de la familia Dendrobatidae, tienen nidos terrestres con desarrollo bifásico. Al ser nidos terrestres la obtención de oxígeno

la realizan por difusión de O<sub>2</sub> del ambiente, razón por la cual ha sido sugerido que las branquias externas embrionarias tienen una función fisiológica en el intercambio gaseoso de los embriones con el medio externo.

Para determinar la influencia que tienen tanto las branquias externas, como la disponibilidad de O<sub>2</sub> en el desarrollo, el presente estudio comparó el desarrollo embrionario de individuos con branquias externas e individuos con sus branquias externas extraídas mecánicamente, bajo diferentes condiciones de oxígeno. En este estudio se observó que, durante el desarrollo embrionario, las branquias externas no son la principal superficie de captación de oxígeno. Debido a las características morfológicas semejantes en los individuos con y sin branquias. Sin embargo las diferentes condiciones de oxígeno probaron ser un factor determinante en la aptitud de los embriones.

En los embriones de las dos especies de *Hyloxalus* con branquias cortadas, en condiciones hipóxicas, se observó regeneración branquial embrionaria, lo que sugiere que las branquias tienen un papel relevante en el proceso de intercambio gaseoso y la tolerancia a ambientes hipóxicos, sin embargo, su presencia y forma varían entre las diferentes familias de anuros, por lo que su funcionalidad durante el desarrollo podría ser variable en distintos grupos. Por las observaciones realizadas en Dendrobátidos y desarrolladores directos se sugiere una importancia estructural de la cola durante el proceso de intercambio gaseoso.

Palabras clave: modos reproductivos, desarrollo directo, branquias externas embrionarias, desarrollo bifásico, oxígeno.

## 2. ABSTRACT

The present study describes and analyzes the embryonic development of several anurans with two different terrestrial reproductive modes. *Noblella* aff. *heyeri*, *Noblella* sp. and *Osornophryne occidentalis* are three species whose embryos develop directly to an adult form. On the other hand, *Hyloxalus nexipus* and *Hyloxalus elachyhistus* are two dendrobatids with terrestrial biphasic embryonic development, which means that eggs develop on land and after hatching their parents transport the tadpoles to water bodies where active feeding begins. In these dendrobatid species, the physiology and development of embryonic external gills were studied to elucidate their role during embryonic development.

Egg clutches of *Noblella* and *Osornophryne* were incubated at 20°C in the laboratory to follow the embryo development until hatching. For the staging, we focused on some features like growth and differentiation of the limbs, appearance of the egg tooth, growth and configuration of the tail, among others. At experimentally controlled conditions, *Osornophryne* embryos develop at a slower developmental rate than *Noblella*, as addressed by the length of the forelimbs. To compare, other developmental events like the pigmentation of the body wall and hind limb growth occurred simultaneously in the three species, despite the different developmental rates and anachronism.

The embryos of *Noblella* aff. *heyeri*, *Noblella* sp. y *Osornophryne occidentalis* do not have external gills, like other direct-developing species outside Eleutherodactylidae, During the embryonic development of the three species, several morphological variations were found which, similar to other studies, suggest that direct development has evolved independently among amphibians.

*Hyloxalus nexipus* and *Hyloxalus elachyhistus* belong to the Dendrobatidae family, they have terrestrial postures with biphasic development. When postures are terrestrial, oxygen must be obtained by diffusion of O<sub>2</sub> from the environment, which is

why it has been suggested that embryonic external gills have a physiological function for gas exchange of the embryos and its surroundings.

To assess the influence of both, the external gills, and the availability of oxygen in the embryonic development, the present study compared the progression of the embryonic development of individuals from both species with external gills and individuals with their external gills extracted mechanically, under different oxygen conditions. Our findings show that gills are not the main surface for oxygen uptake, due to the morphological similarities among subjects with or without gills, nonetheless oxygen proved to be an important factor for embryo fitness.

The embryos from the two species of *Hyloxalus* with the gills extracted, under hypoxic conditions, embryonic regeneration of the gills was observed. This suggests that gills have a relevant role in gas exchange and tolerance to hypoxic conditions. Nonetheless, its presence and shape vary greatly among anuran embryos, so their functionality during development might be variable among amphibian groups.. Our observations in Dendrobatids and direct developers suggest that the tail has a structural value in the oxygen exchange process.

Key words: reproductive modes, direct development, embryonic external gills. Biphasic development, oxygen.

### 3. INTRODUCCIÓN

Los modos reproductivos son parte de las diversas adaptaciones que los anfibios han desarrollado para cumplir con los requerimientos que exige la vida terrestre. Estas estrategias reproductivas están fuertemente influenciadas por las presiones ambientales a las que se encuentran sometidos los anfibios (Liedtke et al., 2017). Debido a las adaptaciones que presentan las estrategias reproductivas, se ha observado diferencias en el desarrollo temprano de los anfibios como: variaciones en los patrones de gastrulación, oogénesis multinucleada, clivajes tempranos asíncronos e irregulares, desarrollo y ramificación de branquias externas, entre otros (Elinson y del Pino, 2012).

En el presente trabajo se estudia distintos aspectos del desarrollo embrionario en especies correspondientes a 3 familias de anuros con diferentes estrategias reproductivas Bufonidae y Craugastoridae, con desarrollo directo y Dendrobatidae, con anidación terrestre y alimentación exotrófica. La morfología y estructuras presentes durante el desarrollo embrionario de las larvas de estos modos reproductivos son diferentes, razón por la cual estudiar las características presentes en el desarrollo nos puede ayudar a comprender mejor la dinámica de los modos reproductivos y las presiones ambientales específicas que los gobiernan. Por otro lado, las especies mencionadas en este estudio se encuentran bajo algún nivel de amenaza según la IUCN y poco se sabe sobre su ecología, reproducción y embriogénesis. Por este motivo, ampliar el conocimiento del desarrollo embrionario es fundamental para la conservación de estas especies; considerando que las presiones ambientales y requerimientos fisiológicos de los embriones son diferentes a las de los renacuajos y adultos.

### 3.1. HISTORIA NATURAL

La familia Bufonidae consta de 610 especies en 52 géneros, está presente en todo el mundo a excepción de Australia (Amphibiaweb, 2018). Las estrategias reproductivas presentes en la familia son diversas, pueden tener un desarrollo embrionario bifásico, con una larva acuática libre, sin embargo, existen también desarrolladores directos terrestres y especies vivíparas (Ron et al., 2018). Dentro de Bufonidae el género *Osornophryne* es un grupo monofilético que contiene 11 especies y se encuentra en las zonas altas de los Andes de Colombia y Ecuador (Yáñez-Muñoz et al., 2010).

*Osornophryne occidentalis*, se encuentra entre los 2500 – 2750 m de altitud, se distribuye en la cordillera occidental de los Andes, es la única especie de este género que se distribuye en el bosque nublado de la estribación occidental del Ecuador y también se encuentra en la provincia de Carchi (Ron et al., 2018). Muy poco se sabe sobre este género, a excepción de los registros de especies nuevas y la categorización de sus representantes bajo algún nivel de amenaza por la IUCN (Páez-Moscoso et al., 2011; Yáñez-Muñoz et al., 2010).

Por otro lado la familia Craugastoridae contiene 121 especies (Amphibiaweb, 2018) y se encuentra dentro del clado Terrarana. Se presume que en este clado la gran mayoría de especies se desarrollan directamente (Liedtke et al., 2017). Dentro de Terrarana se encuentra *Eleutherodactylus coqui*, especie que ha sido considerada modelo para los estudios en desarrollo embrionario directo (Townsend y Stewart, 1985). El género *Noblella* incluye aproximadamente 11 especies distribuidas en los bosques húmedos de la Amazonia y en los Andes de Ecuador, Perú y Bolivia. Pese a que estas especies son localmente abundantes, su distribución es heterogénea y poco se sabe sobre su historia natural (Catenazzi et al., 2015).

La familia Dendrobatidae contiene aproximadamente 314 especies en 20 géneros y está ampliamente distribuida en América central y del sur (Ron et al., 2018). Se puede encontrar a los dendrobátidos en bosques tropicales húmedos, bosques de tierras bajas, bosques de pie montano y ríos, también se encuentran relacionados a

pantanos intermitentes de agua dulce, lagos, pastizales, sabanas húmedas, jardines rurales, plantaciones y bosques excesivamente degradados (Hurme et al., 2003). Los dendrobátidos tienen nidos terrestres y presentan cuidado parental; los machos humedecen los nidos con su orina y al momento de la eclosión, los padres cargan a los renacuajos hacia cuerpos de agua, donde continúan con su desarrollo hasta la metamorfosis (Duellman, 1992).

El género *Hyloxalus* se encuentra ampliamente distribuido a través de América Central y Sudamérica, desde Panamá a Perú. Estas especies habitan regiones costeras, la cordillera andina y la cuenca amazónica. *Hyloxalus elachyhistus* se distribuye del sur de Ecuador hasta el norte de Perú (Duellman, 2004). En el Ecuador, *Hyloxalus elachyhistus* está presente en las Provincias de Loja, el Oro y Azuay, en los bosques: deciduo de la costa, piemontano oriental, montano oriental, montano occidental y el matorral interandino, desde 710 a 2760 m.s.n.m (Ron et al., 2018). La temperatura media anual de los hábitats en los que la especie se encuentra varía de 12 a 24°C y la precipitación media anual varia de 500 a 2000 mm (Coloma, 1995). *Hyloxalus nexipus*, se encuentra desde el sur occidente del Ecuador hasta el norte de Perú. En Ecuador, esta especie se encuentran en la provincia de Morona Santiago, donde habita de 500 a 1500 m.s.n.m, en zonas con una temperatura media anual de 18 a 24° C, donde la precipitación media anual es de 1000 a 4000 mm (Coloma, 1995; Duellman, 2004).

### **3.2. MODOS REPRODUCTIVOS**

El grupo de los anfibios abarca aproximadamente 7000 especies (Amphibiaweb, 2018), siendo los vertebrados terrestres con mayor diversidad de estrategias reproductivas. Estas estrategias han sido guiadas por la evolución repetitiva de la reproducción terrestre y del desarrollo directo a partir de sus ancestros acuáticos (Gomez-Mestre et al., 2012). Los modos reproductivos en los anfibios describen una combinación de características que incluyen, el sitio de oviposición, velocidad y

duración del desarrollo, estadio y tamaño del embrión al eclosionar, tipo de cuidado parental, características del huevo y el nido (Haddad y Prado, 2005).

Dentro de las varias estrategias reproductivas que los anuros poseen se puede mencionar al modo clásico, el cual involucra una larva acuática libre que experimenta metamorfosis para alcanzar su forma terrestre adulta (Haddad & Prado, 2005). A partir de este modo surgen otros que no son netamente acuáticos sino terrestres, en los cuales los embriones se desarrollan en nidos de espuma flotantes o son larvas endotróficas, en cuyo caso, son incubados dentro del marsupio de la madre e incluso existen casos en que los embriones pueden ser incubados dentro del cuerpo de sus progenitores (Elinson & del Pino, 2012; Duellman, 1992). Algunos renacuajos pueden desarrollarse a partir de la yema sin alimentarse (endotróficos), incluso existen casos en los cuales el estadio larval libre ha sido omitido y los embriones se desarrollan directamente en pequeñas ranas (Gomez-Mestre et al., 2012).

### **3.2.1. DESARROLLO DIRECTO**

El desarrollo directo, como se ha mencionado previamente, involucra la ausencia de una fase larval de alimentación activa (exotrófica); en su lugar, los embriones se desarrollan en sus capas de protección hasta eclosionar como pequeñas ranas (de Lima et al., 2016). El desarrollo directo ha aparecido independientemente en varios grupos de anfibios con diferentes variantes, tanto terrestres como acuáticos, exotróficos como endotróficos, y es considerado el modo reproductivo más evolucionado debido a la independencia de cuerpos de agua para la reproducción y el desarrollo de los embriones (Gomez-Mestre et al., 2012).

La falta de un estadio larval acuático ha favorecido al desarrollo directo en condiciones ambientales extremas, el agua puede escasear o no existe un hábitat adecuado para el desarrollo de larvas acuáticas (Schweiger et al., 2017). Los desarrolladores directos muestran diferencias en estructuras específicas de los renacuajos, como el sistema de línea lateral, la glándula de cemento, las partes

bucales de las larvas o el intestino, estas estructuras pueden estar ausentes o ser reducidas durante el desarrollo (de Lima et al., 2016). De igual forma la gran mayoría de embriones con desarrollo directo estudiados hasta la actualidad, presentan ciertas similitudes, como una gran reserva de yema, una cola membranosa altamente vascularizada, reducción o ausencia de las branquias externas, desarrollo temprano y casi simultáneo de las extremidades delanteras y posteriores (Anstis, 2008; de Lima et al., 2016; Goldberg et al., 2012; Jennings y Hanken, 1998; Nokhbatolfoghahai et al., 2010; Schweiger et al., 2017; Townsend y Stewart, 1985).

El desarrollo directo ha sido identificado en una gran variedad de grupos de anuros, por ejemplo, Arthroleptidae, Bufonidae, Microhylidae, Myobatrachidae, Ranidae, Rhacophoridae, Sooglossidae y Terrarana. En grupos como Terrarana, todas las especies descritas hasta el presente son desarrolladores directos (Schweiger et al., 2017). Por otro lado, estudios en bufonidos sugieren que el ancestro común más reciente para las radiaciones africanas de Bufonidae tenía renacuajos especializados en cuerpos de agua transitorios, carácter que evolucionó dos veces, renacuajos adaptados al terreno empinado una vez, nidos terrestres dos veces y la viviparidad dos veces, todas de forma independiente (Liedtke et al., 2017). En el presente estudio se analiza el desarrollo de dos miembros del grupo terrarana, *Noblella* aff. *heyeri* y *Noblella* sp., de la familia Craugastoridae y también se analiza a una especie externa de este grupo, *Osornophryne occidentalis*, de la familia Bufonidae. Estas tres especies son pertenecientes a la región interandina.

### **3.2.2. BRANQUIAS EXTERNAS EMBRIONARIAS**

Durante el desarrollo embrionario, los anfibios pueden tener hasta cuatro superficies de intercambio respiratorio: branquias, internas como externas, piel y pulmones; de las cuales, al menos tres son funcionales al mismo tiempo. Las branquias embrionarias externas de los anfibios son estructuras transitorias, que aparecen como yemas en el estadio 19 (Gosner, 1960), desarrollándose hasta su máxima extensión en estadio 23. Posteriormente, las branquias sufren una regresión

y son cubiertas por la extensión del opérculo en estadio 25, momento en el cual eclosionan, y la larva de acuática de vida libre inicia su alimentación. (Nokhbatolfoghahai et al., 2013) .

En especies con eclosión temprana (estadios 16-19) como *Agalychnis callidryas*, se ha observado que las branquias externas están presentes aun en los primeros estadios posteriores a la eclosión en embriones jóvenes, o han sido reabsorbidas por completo al momento de eclosionar en embriones más avanzados (Warkentin, 2000). Al momento de la eclosión los embriones de *A. callidryas* tienen desarrollados los órganos digestivos, las partes bucales, las branquias internas, cola y pulmones, pero su sistema sensorial sigue sin estar completamente desarrollado (Rogge & Warkentin, 2008; Warkentin, 1999). En especies con eclosión tardía las branquias están presentes a partir del estadio 19, hasta inicios del estadio 25. Es en estos estadios se da el desarrollo de estructuras importantes del embrión, como la formación de los ojos, la pigmentación del cuerpo, elongación y vascularización de la cola, la formación de los dientes y el sistema digestivo (Nokhbatolfoghahai et al., 2013) .

Las branquias externas desempeñan un rol en el intercambio gaseoso del embrión con el medio externo (Shield y Bentley, 1973). Por ejemplo, en hílidos como *Agalychnis callidryas*, la longitud de las branquias varía de acuerdo a la concentración de oxígeno: embriones que se encuentran en altas concentraciones de oxígeno desarrollan branquias cortas, a diferencia de embriones que se encuentran en bajas concentraciones de oxígeno, que desarrollan branquias más largas (Warkentin, 2000). En *A. callidryas* las branquias tienden a posicionarse en las zonas con mayor concentración de oxígeno dentro de la membrana vitelina, lo cual optimiza la difusión, especialmente en embriones con concentraciones de oxígeno bajas dentro del huevo (Reizis et al., 2005; Warkentin, 2002). Por esta razón, la ubicación de las branquias dentro del huevo no es aleatoria y en embriones con hipoxia o que la ubicación de las branquias se cambia experimentalmente, la rotación ciliar se acelera hasta que las branquias se encuentran en lugares con altas concentraciones de oxígeno (Warkentin, 2007).

En dendrobátidos, las branquias externas se forman a partir de la yema de las branquias que sobresalen del tercer y cuarto arcos branquiales del embrión (Del Pino et al., 2004). Los dos pares de branquias externas se forman a medida que continúa el desarrollo. Mientras las branquias externas anteriores van creciendo, se puede observar ramificaciones a lo largo del eje principal. Las branquias externas posteriores no presentan ramificaciones (Hervas et al., 2015). Se ha observado en la mayoría de dendrobátidos que las branquias están presentes a partir del estadio 19, alcanzan su máxima extensión durante el estadio 23 y comienzan su regresión a partir del estadio 24, para no ser observables externamente en el estadio 25 (Contreras, 2015; Del Pino et al., 2004; Hervas et al., 2015).

Existen especies que carecen de branquias y la difusión es suficiente para suministrar oxígeno al embrión para su desarrollo; de la misma forma, otras especies poseen branquias muy elaboradas morfológicamente y su regulación está determinada por el ambiente, lo que sugiere una importancia funcional distinta para cada grupo (Warkentin, 2002). En especies de las familias: Leiuperidae, Leptodactylidae, Aromobatidae, Hylidae, Microhylidae, Bufonidae y Ranidae, se ha observado que las branquias externas son más elaboradas en especies que poseen eclosión más retardada en relación a especies que poseen eclosión más temprana. Lo que lleva a sugerir que las diferencias en la morfología branquial están relacionadas al ambiente de desarrollo y la filogenia (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2008). Los anuros de la familia dendrobatidae presentan eclosión retardada, tienen branquias externas muy elaboradas, largas y con varias ramificaciones (Contreras, 2015; Del Pino et al., 2004; Hervas et al., 2015). Estas características nos llevan a suponer que las branquias externas en dendrobatidae cumplen un rol durante el desarrollo previo a la eclosión, semejante al observado en otras especies con eclosión retardada; sin embargo, no existen estudios al respecto.

### 3.3. HIPÓXIA EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

La gran diversidad de formas, ambientes y estilos de vida han permitido a los vertebrados menores (peces, reptiles y anfibios) adquirir adaptaciones que les permiten tolerar diferentes concentraciones de oxígeno; incluso la falta de oxígeno (anoxia) por periodos prolongados de tiempo (Bickler y Buck, 2007). El desarrollo embrionario es un proceso aeróbico, en el cual la demanda de oxígeno es superior conforme la yema se va transformando en tejido metabólicamente activo, razón por la cual, falta de oxígeno en el ambiente (hipóxia), puede determinar un desarrollo más lento, mortalidad de los embriones y selección a favor de caracteres que ayuden a mejorar el suministro de oxígeno (Seymour et al., 2000). Usualmente las cubiertas de los huevos protegen al embrión en desarrollo y le imponen constricciones en su microambiente, incluyendo barreras para la difusión del oxígeno (Rogge y Warkentin, 2008). Es así que, para elucidar la funcionalidad respiratoria de las branquias externas embrionarias en los anfibios, es necesario comparar el desarrollo de embriones bajo diferentes condiciones de oxígeno, tanto con branquias externas, como sin branquias externas. Estos datos pueden ayudar a identificar el papel que desempeñan las branquias en el intercambio gaseoso y el consumo energético durante el desarrollo, el rol que cumplen en la organogénesis de los anuros, al igual que su adaptación a diferentes condiciones ambientales y sus diversos modos reproductivos.

### 3.4. OBJETIVOS

#### 3.4.1. GENERAL

- Analizar la fisiología y desarrollo de las branquias embrionarias de *Hyloxalus nexipus* e *Hyloxalus elachyhistus*, junto con la descripción morfológica de la progresión del desarrollo directo de *Noblella* aff. *heyeri*, *Noblella* sp. y *Osornophryne occidentalis*.

### 3.4.2. ESPECÍFICOS

- Examinar el funcionamiento y morfología de las branquias embrionarias en dos anuros de la familia Dendrobatidae, mediante análisis morfológicos y fisiológicos.
- Comparar el desarrollo de individuos con branquias embrionarias e individuos sin branquias embrionarias (branquias externas extraídas mecánicamente) para dilucidar cambios en la morfología y tiempo de desarrollo.
- Describir el progreso del desarrollo embrionario en *Noblella* aff. *heyeri*, *Osornophryne occidentalis* y *Noblella* sp.
- Determinar cambios en el desarrollo de embriones con diferentes modos reproductivos, con especial interés en sus estrategias respiratorias.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS EMBRIONES

Los embriones de *Hyloxalus helachyhistus* e *Hyloxalus nexipus* se obtuvieron de nidos donados por la Iniciativa de Conservación “Balsa de los Sapos” de la Pontificia Universidad Católica de Ecuador (PUCE). Los embriones de *Noblella* aff. *heyeri* con la serie de campo (SC) 48800 y *Osornophryne occidentalis* (SC 48590) fueron colectados en Cerro Golondrina, Carchi, Ecuador. El nido de *Noblella* sp. fue depositado en laboratorio por los parentales (SC 61909, SC 61910), estos provenían de la Cordillera del Cutucú, Morona Santiago, Ecuador (-2.77775, -78.16005). Estos nidos fueron donaciones del proyecto “Arca de Noé”, perteneciente al Museo de Zoología QCAZ, sección herpetología. En laboratorio, los embriones fueron incubados a la temperatura ambiente (18-24°C) en una cámara húmeda, que consiste en una caja Petri, papel absorbente, agua destilada y plástico (Del Pino et al., 2004). La caja Petri fue rotulada con los datos correspondientes al nido y se realizó un registro del nombre de la especie, el número de huevos depositados, el estadio en que se encuentran los huevos, la fecha y hora a la que se encontró el nido, número del terrario de procedencia y anotaciones específicas de cada nido.

### 4.2. PROCESAMIENTO Y FIJACIÓN DE LOS EMBRIONES

#### 4.2.1. SOLUCIONES Y FIJATIVOS

##### 4.2.1.1. SOLUCIÓN DE STEINBERG (Rugh, 1965)

- 58 mm NaCl
- 0.65 mm KCl

- 0.85 mm MgSO<sub>4</sub>
- 5 mm Tris, pH 8
- 0.34 mm Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
- Agua destilada

#### **4.2.1.2. FIJATIVO DENT'S.**

- 80% Me(OH)
- 20% DMSO

#### **4.2.1.3. PROCESAMIENTO DE EMBRIONES.**

Los embriones de las diferentes especies fueron manipulados y observados en la solución de Steinberg 1x (4.2.1.1). Los estadios de *H. elachyhistus* y *H. nexipus* fueron asignados a partir de la comparación de su desarrollo externo con la tabla de desarrollo de *Epipedobates machalilla* (Del Pino et al., 2004). Los estadios de *Noblella* aff. *heyeri*, *Noblella* sp. y *Osornophryne occidentalis* fueron adoptados a partir de la comparación del desarrollo externo con la tabla del desarrollo de *Eleutherodactylus coqui* (Townsend y Stewart, 1985), la tabla del desarrollo de *Adelophryne maranguapensis* (de Lima et al., 2016) y la tabla del desarrollo del género *Arthroleptis* (Schweiger et al., 2017).

#### **4.2.1.4. FIJACIÓN DE LOS EMBRIONES.**

Para fijar los embriones se les retiró las capas de gelatina con la asistencia de pinzas de relojero bajo el microscopio. Se manipuló a los embriones en la solución salina de Steinberg 1x (4.2.1.1).

#### **4.2.1.5. FIJACIÓN CON DENT'S.**

Los embriones sin gelatina fueron fijados durante 24 horas en el fijativo Dent's (4.2.1.2). Los embriones fueron transferidos al fijativo gradualmente, primero a una solución 75% Steinberg, 25% Dent's, luego a una solución 50% Steinberg, 50% Dent's, posteriormente a una solución 25% Steinberg, 75% Dent's y finalmente se los transfirió a una solución 100% Dent's, en la cual permanecieron por 24 horas, para finalmente ser almacenados en tubos eppendorf de 1,5 ml con Metanol 100% a -20 °C.

#### **4.3. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE EMBRIONES CON DESARROLLO DIRECTO.**

Durante el periodo de incubación de *Noblella* sp., *N. aff. heyeri* y *O. occidentalis* se llevó un registro fotográfico diario. Para *N. aff. heyeri* y *O. occidentalis* se extrajo diariamente un embrión de su corión y posteriormente se lo fijó en Dent's (4.2.1.2). Con *Noblella* sp., debido a la disponibilidad baja de embriones, se realizó el registro fotográfico diario de los embriones dentro de su corión hasta la eclosión. Para la identificación de los estadios se comparó su morfología externa con tablas del desarrollo de *Eleutherodactylus coqui* (Townsend y Stewart, 1985), *Adelophrine maranguapensis* (de Lima et al., 2016), y *Arthroleptis* (Schweiger et al., 2017).

#### **4.4. EFECTOS DE LA HIPÓXIA EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO.**

Para observar los cambios que pueden presentarse en el desarrollo de los embriones y evidenciar si hay algún tipo de respuesta a la variación de oxígeno en el ambiente, se procedió a introducir a los embriones con branquias extraídas y con branquias intactas, en pequeñas cámaras con diferentes condiciones de oxígeno. Estas cámaras consistían en tubos de microcentrifugación de 2ml, los cuales

contenían a los embriones bajo tres diferentes métodos de oxigenación (Figura. 1): el primer tratamiento consistió en intentar reproducir las condiciones normales de los embriones dentro del huevo, para esto se redujo la cantidad de solución Steinberg en el tubo (0,5 ml), permitiendo el contacto con el oxígeno superficial (Normoxia = N). El segundo método buscó reducir el contacto del embrión con el oxígeno superficial (hipoxia leve = HL), para ello la cámara consistió en un tubo lleno (2 ml) de Steinberg 1X sin sellar. El último tratamiento consistió en un tubo lleno con Steinberg 1x (4.2.1.1) y sellado herméticamente con Parafilm, para evitar el flujo de oxígeno por completo (Hipoxia severa = HS). Se mantuvo un grupo control el cual no estuvo sometido a ningún experimento.

Cabe recalcar que todos los embriones se encontraban en estadio 19 al iniciar los diferentes tratamientos. Éstos se llevaron a cabo hasta que el grupo control alcanzó el estadio 23, en el cual se visualiza la máxima extensión branquial, la formación de los ojos, el corazón, el cerebro y otras estructuras importantes (Gosner, 1960).

#### **4.5. EXTRACCIÓN MECÁNICA DE LAS YEMAS BRANQUIALES**

Para comprender la importancia de las branquias externas durante el desarrollo embrionario, se observó y documentó las diferencias que pudiesen observarse en el transcurso del desarrollo de embriones con branquias externas y embriones sin branquias externas, removidas mecánicamente. En el momento que los embriones de *H. elachyhistus* y *H. nexipus* alcanzaron el estadio embrionario 19 y se pudo observar las yemas de las branquias externas (Gosner, 1960), se dio inicio al experimento. Estudios previos han mostrado diferentes formas en las que se puede inducir la regresión de las branquias externas: se ha observado que colocarlos en agua hiperóxica puede provocar la regresión de las branquias (Warkentin, 2002), también la aplicación de prostaglandinas induce su regresión (Warkentin y Wassersug, 2001; Warkentin, 2002). En el presente estudio se extrajo las branquias de forma mecánica, mediante el uso de pinzas de disección.

Primero, se extrajeron los embriones de sus capas protectoras embrionarias (membrana vitelina) y se los colocó en pocillos separados que contenían Steinberg 1X (4.2.1.1). Posteriormente, se separó cada nido en dos grupos, uno en el cual los embriones conservaron sus branquias intactas y otro grupo al cual se realizó la abscisión mecánica de las yemas branquiales, mediante el uso de pinzas de relojero (cut). Se realizaron registros fotográficos de los individuos de ambos grupos previa y posteriormente a la abscisión branquial.

#### **4.6. ANALISIS DE IMÁGENES Y MORFOMETRÍA**

Este proceso se lo llevó a cabo bajo un estereoscopio OLYMPUS SZX16 con iluminación asistida por lámparas de fibra óptica KL 1500 (Zeiss). Los registros fotográficos se los llevó a cabo en el programa CellSense standard. Para identificar variaciones en el desarrollo embrionario de individuos con branquias e individuos sin branquias en las diferentes condiciones de oxigenación, se realizaron varias medidas morfométricas (Figura 1 E; Anexo. 1) con la ayuda del software ImageJ 1.5 (Schneider et al., 2012). De igual manera se cuantificaron otros factores que podían observarse en los embriones como lo fueron, la supervivencia, presencia de edema, desarrollo del cristalino y formación de la aleta caudal. Las medidas tomadas (Figura.1 E; Anexo. 1) fueron: longitud total del embrión (desde la cabeza a la cola), ancho de la cabeza (del extremo izquierdo al derecho de la cabeza, en la zona media de los ojos), ancho de la yema (de un extremo al otro en la zona media de la yema), longitud cuerpo-cola (desde el opérculo hasta la cola), ancho de la cola, longitud de las branquias (longitud de la rama principal de las branquias anteriores). Las medidas se calcularon a partir de la diferencia de las medidas morfológicas del día final y las del día inicial de experimentación ( $\Delta$ ) (Figura. 6 A-G; Anexo 2). El porcentaje de supervivencia se obtuvo a partir de la proporción de individuos vivos por tratamiento, el día final de experimentación (Figura. 6 H; Anexo. 3). Los análisis de la presencia de edema, cristalino y formación de aleta se cuantificaron a partir de la proporción de individuos

por tratamiento que presentaban estas estructuras el día final de experimentación (Figura. 6 I-K; Anexo. 4, 5, 6).

Se asignó una valoración numérica a todas las variables a partir de los resultados obtenidos, de manera que todas las variables de estudio fueron de tipo cuantitativo. Para observar si las diferentes condiciones de oxígeno tienen un efecto real sobre las variables se realizó un ANOVA y para observar las relaciones existentes entre los tratamientos y dentro de los tratamientos, se realizó una prueba post hoc de significación de Tukey. Ambas pruebas se realizaron con el paquete estadístico IBM SPSS® versión 23.0 (IBM corp, 2015)

## 5. RESULTADOS

### 5.1. EL DESARROLLO DIRECTO DE *Noblella* sp., *Noblella* aff. *heyeri*, *Osornophryne occidentalis*.

#### 5.1.1. DESARROLLO DE LOS EMBRIONES DE *Noblella* sp., *Noblella* aff. *heyeri*, *Osornophryne occidentalis*.

Los estadios del desarrollo de las tres especies se basaron en cambios morfológicos externos, los cuales fueron clasificados según la tablas del desarrollo embrionario de *Eleutherodactylus coqui* (Townsend y Stewart, 1985), *Adelophryne maranguapensis* (De lima et al., 2016) y *Arthrolepis* (Schweiger et al., 2017). Debido a la limitación del número de embriones colectados por cada nido de las tres especies, el tiempo completo del desarrollo embrionario no fue descrito. En su lugar, se calculó el tiempo de desarrollo embrionario a partir del estadio en el cual los nidos de las tres especies se encontraron al momento de procesarlos. Los embriones de las dos especies de *Noblella*, que se encontraron en estadio cinco, tenían una coloración blanca y carecían de pigmento, estaban cubiertos por una capa vitelina gruesa y una capa de gelatina rígida con consistencia pegajosa que poseía vestigios de hojarasca y envolvía a la vitelina. Los embriones se desarrollan en la parte superior de la yema y son visibles a través de las capas transparentes (Figura 2 A, Figura 3 A).

Se analizaron en total cuatro nidos: dos nidos de *Noblella* aff. *heyeri*, uno de *Osornophryne occidentalis* y un nido de *Noblella* sp. Los nidos colectados se encontraron en diferentes estadios del desarrollo: los embriones de *Noblella* sp. y de uno de los nidos de *Noblella* aff. *heyeri*, se encontraron en estadio 5 (Figura 2 A, Figura 3 B), sin embargo, los embriones de un nido de *N. aff. heyeri* se determinaron muertos después de ser observados durante cuarenta y siete horas. El otro nido de *N. aff. heyeri* se encontraba en estadio 11 y fue posible su documentación hasta el estadio 14 después de 240 horas de observación aproximadamente (Figura 2). Los embriones de *O. occidentalis* se encontraban en estadio 8 y se desarrollaron hasta el estadio 14,

después de 456 horas (Figura 5). El nido de *Noblella* sp., fue documentado desde el estadio 5 hasta el estadio 15 (Figura 3; 4), después de 768 horas de observación, fue el único embrión que llegó a la eclosión.

### **5.1.2. MORFOLOGÍA EMBRIONARIA Y DESARROLLO DE *Noblella* sp., *Noblella* aff. *heyeri* y *Osornophryne occidentalis***

#### **5.1.2.1. DESARROLLO, MORFOLOGÍA Y COMPORTAMIENTO DE LOS EMBRIONES**

En el estadio 5 se puede observar la diferenciación de varias estructuras en las tres especies. En *Noblella* aff. *heyeri*, en la cabeza se distinguen dos regiones principales, óptica y ótica y se pueden observar también las yemas de las extremidades (Figura 2 A). En *Noblella* sp., durante el estadio 5, las yemas de las extremidades se observan como estructuras de forma ovoide (Figura 3 B), en la cabeza se puede identificar la región óptica y la región ótica, los depósitos de calcio endolinfáticos (DCE) son visibles en este estadio en la parte posterior de la cabeza (Figura 3 C). No existen registros de *Osornophryne occidentalis* para este estadio.

Los estadios 6 y 7 solo pudieron ser observados en *Noblella* sp. Durante el estadio 6 se da el inicio de la expansión de la cobertura secundaria, capa de pigmento que delimita la pared del cuerpo (Figura 3 D). En estos estadios las yemas de las extremidades posteriores empiezan a elongarse y los DCE empiezan a ser rodeados por células de pigmento (Figura 3 E). En este estadio la cola inicia su movimiento. En el estadio 7 se observa la formación de las vesículas ópticas en la parte anterior de la cabeza (Figura 3 G), las yemas de las extremidades posteriores están más elongadas y las yemas de las extremidades anteriores han iniciado su elongación (Figura 3 G), la cobertura secundaria continúa expandiéndose y ha empezado a recubrir la yema (Figura 3 F). Los movimientos de la cola son más bruscos y empiezan a guiar los movimientos del embrión dentro del huevo.

El estadio 8 se lo pudo observar en dos especies. En *Noblella* sp., la boca se puede observar por primera vez (Figura 3 I), la cola se ha extendido y alcanza 1/3 de la longitud total del embrión (Figura 3 H), los ojos se distinguen en pupila e iris por primera vez (Figura 3 I), las células de pigmento alrededor de los DCE han proliferado en mayor cantidad. En *Osornophryne occidentalis*, la cola ha alcanzado la longitud total del embrión, los ojos son visibles por primera vez, la cobertura secundaria se ha expandido y bordea la línea media del embrión, las extremidades anteriores se encuentran desarrollándose debajo del opérculo (Figura 5 A), mientras en las extremidades posteriores se puede diferenciar el autopodio y los rudimentos digitales (Figura 5 B).

En *Noblella* sp., durante el estadio 9 se puede observar que: el iris está completamente pigmentado, mientras que la pupila sigue despigmentada (Figura 3 J, K), las extremidades han continuado con su elongación y los rudimentos digitales son visibles (Figura 3 L), los DCE están cubiertos por pigmento parcialmente (Figura 3 K). En *O. occidentalis*, en las extremidades posteriores se puede distinguir claramente al autopodio, zeugopodio y estilopodio (Figura 5 D), las extremidades anteriores continúan debajo del opérculo (Figura 5 C). En este estadio la boca se abre por primera vez, permitiendo diferenciar mandíbula superior e inferior. En los ojos, tanto el iris como la pupila presentan una coloración oscura.

En el estadio 10, en *Noblella* sp., los DCE han sido cubiertos casi en su totalidad por el pigmento de la cabeza (Figura 4 B), la pigmentación del iris y la pupila se ha vuelto más oscura (Figura 4 C); también se observa que la cola tiene la longitud del tamaño medio del embrión (Figura 4 A). En *Osornophryne occidentalis*, los ojos todavía mantienen una pigmentación negra (Figura 5 E), la cobertura secundaria se ha expandido dejando un pequeño espacio en la línea media del embrión (Figura 5 E). Las extremidades anteriores son visibles y las extremidades posteriores continúan creciendo (Figura 5 E, F). Durante este estadio las tres especies iniciaron el movimiento de sus extremidades mediante flexiones y torciones de las articulaciones.

El estadio 11 se pudo apreciar en las tres especies. En *Noblella* aff. *heyeri*, las extremidades se han diferenciado y los dígitos también se pueden diferenciar (Figura

2 B, C). La cola tiene el mismo tamaño que el embrión y se puede distinguir una raíz central y una aleta membranosa (Figura 2 B). En *Noblella* sp., la cobertura secundaria y las extremidades continúan expandiéndose (Figura 4 D, E). En *O. occidentalis*, la cobertura secundaria está cerca de cerrarse y los rudimentos digitales continúan sin diferenciarse (Figura 5 G, H), la cola muestra circulación y su tamaño supera al del embrión (Figura 5 G).

Durante el estadio 12, en *Noblella* aff. *heyeri*, las extremidades superiores se han diferenciado por completo, pero continúan su crecimiento (Figura 2 D, E), la cubierta secundaria ha rodeado casi todo el embrión, pero sigue sin cerrarse totalmente (Figura 2 D). En *Noblella* sp., la cola y las extremidades continúan elongándose (Figura 4 F). En *O. occidentalis*, la pigmentación del iris disminuye y adquiere un color ligeramente azul (Figura 5 I), el cual es más marcado a finales del estadio 12 (Figura 5 J), las extremidades están bien diferenciadas y se observan globulos rojos a lo largo de la cola (Figura 5 I). Es en este estadio que la locomoción guiada por la cola finaliza, y las extremidades posteriores se convierten en la fuente principal de movimiento hasta la eclosión.

En el estadio 13, en *Noblella* aff. *heyeri* se observa la extensión total de las maxilas hasta la parte posterior del ojo y el diente del huevo se observa por primera vez (Figura 2 G). Los dígitos también se diferencian claramente (Figura 2 G) y el ojo presenta una coloración oscura en el iris y la pupila (Figura 2 G). En *Noblella* sp., las extremidades continúan su elongación (Figura 5 G) y los ojos mantienen la pigmentación oscura (Figura 5 H). En *O. occidentalis* los ojos adquieren una coloración mas clara (Figura 5 K, L).

Durante el estadio 14 se puede observar que varias estructuras han terminado su desarrollo en las diferentes especies. En *Noblella* aff. *heyeri*, las extremidades han completado su desarrollo y los dígitos están bien diferenciados (Figura 2 I), los ojos presentan la coloración semejante a la de los adultos y la cobertura secundaria se ha cerrado (Figura 2 H). En *Noblella* sp., se puede observar que las extremidades están totalmente desarrolladas (Figura 4 I), los ojos se han desarrollado por completo (Figura 4 J) y el diente del huevo también es visible (Figura 4 K). En *O. occidentalis*, la cola ha

alcanzado su longitud total y las extremidades de igual manera (Figura 5 M). Los ojos también se han desarrollado por completo (Figura 5 N).

El estadio 15 solo pudo ser documentado en *Noblella* sp. En este estadio los embriones ya han eclosionado en pequeñas ranas, la cola se ha retraído por completo y la pigmentación del cuerpo es similar a la de los adultos (Figura 4 L). Cabe recalcar que en ninguna de las tres especies se pudo evidenciar la formación de branquias externas embrionarias durante el desarrollo.

#### **5.1.2.2. DEPÓSITOS DE CALCIO ENDOLINFÁTICOS (DCE).**

Los depósitos de calcio endolinfáticos (DCE) corresponden a una porción del ducto endolinfático. Estas estructuras están asociadas a los órganos auditivos y la deposición de carbonato de calcio para la calcificación ósea durante el desarrollo embrionario (De Lima et al., 2016). En las dos especies de *Noblella*, los depósitos de calcio endolinfáticos son evidentes por primera vez durante el estadio 5 como dos puntos blancos, ubicados posteriormente a la región óptica en la cabeza (Figura 2 A; 3 B). Estos puntos adquieren una forma más redonda en el estadio 6 (Figura 3 G), y muestran un alargamiento hacia la zona caudal en el estadio 7 (Figura 3 I), durante los estadios 8 y 9, los DCE empiezan a ser cubiertos por pigmento (Figura 3 J, k), al llegar al estadio 10 los DCE están cubiertos por pigmento casi en su totalidad y pueden apreciarse parcialmente como dos cuerpos blancos con forma de horma de zapato posteriores a los ojos (Figura 4 B). En el estadio 11 los DCE se han fusionado y se observan como una masa blanca posterior al romboencéfalo. Los DCE han sido cubiertos en su totalidad por el pigmento del embrión para el estadio 12, mientras, en *Osornophryne occidentalis*, los DCE se encuentran completamente cubiertos por pigmento en el estadio 11.

### 5.1.2.3. FORMACIÓN DE LA COBERTURA SECUNDARIA Y PIGMENTACIÓN.

En las dos especies de *Noblella*, durante el estadio 5 se puede observar la aparición de melanóforos a lo largo del tronco y la cabeza del embrión; se observa además, la formación de un disco de melanóforos en el centro del embrión, entre las extremidades anteriores y posteriores. Las yemas de las extremidades aún carecen de pigmento y tampoco se observa melanóforos en la yema (Figura 3 A; 4 B). Para el estadio 6, la pared del cuerpo se ve delimitada por el disco de pigmento, en el cual la cantidad de melanóforos presentes ha aumentado considerablemente (Figura 4 E). En los estadios 7, 8, 9 se puede observar como el disco de melanóforos se ha ido expandiendo, llegando la cobertura secundaria a cubrir un tercio de la yema y la cantidad de pigmento en la cabeza ha aumentado, empezando a cubrir los DCE. La progresión de los melanóforos en las extremidades y la cola es visible, aunque en el estadio 9, todavía se encuentra ausente en las zonas distales de las mismas (Figura 4 G, H, J, K, L).

A finales del estadio 10, la cobertura secundaria ha rodeado la yema prácticamente en su totalidad. El embrión también está cubierto por pigmento, adquiriendo una tonalidad oscura. Las extremidades se encuentran pigmentadas, excepto los dígitos y la parte interior de las extremidades. La cola también se encuentra pigmentada a excepción de la aleta caudal (Figura 4 A-C). Durante el estadio 13 se puede observar cómo los dígitos también han comenzado a pigmentarse y la pared del cuerpo ha cubierto a la yema por completo, cerrándose cada vez más en la línea media del embrión (Figura 2 G; 4 H). En el estadio 14, en *N. aff. heyeri*, se observa una menor cantidad de melanóforos por lo cual el embrión no tiene una tonalidad tan oscura, sin embargo, los melanóforos ya se encuentran distribuidos por todo el embrión, la pared del cuerpo también se ha cerrado por completo (Figura 2 H, I). En *Noblella* sp., se observa como la pared del cuerpo se ha cerrado en la línea media y el pigmento cubre al embrión en su totalidad. Al finalizar este estadio se puede observar que el embrión presenta una coloración semejante al adulto (Figura 4 I, J).

En *O. occidentalis*, se puede observar en el estadio 8 una fuerte presencia de melanóforos alrededor de todo el embrión, a excepción de los dígitos, la cobertura secundaria también a cubierto la yema en su totalidad (Figura 5 A, B). Durante los estadios 10 y 11, la pigmentación de las extremidades ha incrementado y la pared del cuerpo recubre prácticamente todo el embrión, aunque sigue sin cerrarse en la línea media (Figura 5 E, G). En los estadios 12 y 13, la coloración del embrión ha cambiado un poco, tornándose café claro en el centro del embrión, y café oscuro las extremidades, cola y cabeza, también se observa que la cobertura secundaria ya se ha cerrado por completo (Figura 5 J, K). En el estadio 14 la coloración ya se asemeja más a la de los adultos (Figura 5 M, N).

#### **5.1.2.4. MORFOLOGÍA Y DESARROLLO DE LAS EXTREMIDADES.**

En *Noblella* aff. *heyeri* y *Noblella* sp., las yemas de las extremidades aparecen temprano en el desarrollo. Durante el estadio 5, se las puede observar como pequeños cuerpos blancos redondeados, ubicadas a los lados del tubo neural y unidas al tronco. Las yemas posteriores se encuentran más elongadas que las anteriores (Figura 2 A, Figura 3 B). Las yemas continúan su elongación y en el estadio 7 se observan constricciones en las yemas posteriores, estas constricciones darán lugar a la articulación de la rodilla y la formación del estilopodio y el zeugopodio (Figura 3 G). En el estadio 9 se puede observar otra constricción en la parte distal de las patas, delimitando así el autopodio, las extremidades anteriores han aumentado de tamaño pero siguen siendo más pequeñas que las extremidades posteriores y los rudimentos digitales empiezan a formarse en las extremidades posteriores (Figura 3 L). Durante los estadios 11 y 12, los quiridios (estilopodio, zeugopodio y autopodio), se diferencian completamente tanto en las extremidades anteriores como posteriores, también la diferenciación de los dígitos es más evidente (Figura 2 C y E; 4 D y E). En el estadio 14, las extremidades han aumentado considerablemente de tamaño, especialmente las extremidades anteriores (Figura 4 I) y los dígitos ya se asemejan a los del adulto (Figura 2 H, I).

En *O. occidentalis*, el estilopodio y zeugopodio en las extremidades posteriores son evidentes en el estadio 8, al igual que los rudimentos digitales. Las extremidades anteriores se encuentran desarrollándose dentro del pliegue opercular y no se las puede observar (Figura 5 A, B). Durante el estadio 9 se produce la constricción que dará lugar al autopodio y los rudimentos digitales empiezan a diferenciarse (Figura 5 C, D). En el estadio 10, las extremidades anteriores son liberadas del pliegue opercular y se puede distinguir claramente los quiridios (estilopodio, zeugopodio y autopodio), mientras las extremidades posteriores continúan su elongación (Figura 5 E, F). Durante los estadios 11, 12 y 13, las extremidades continúan con su crecimiento y los rudimentos digitales aún están presentes y sin diferenciación (Figura 5 H, I, K). A finales del estadio 14 se puede observar que las extremidades ya muestran cierta semejanza a las extremidades de los adultos, los dígitos mostraron una diferenciación leve, aunque siguen asemejándose a los rudimentos digitales (Figura 5 M, N).

#### 5.1.2.5. DESARROLLO DE LA COLA.

En las dos especies de *Noblella*, para el estadio 5 la cola ya es visible. La cola continúa con su elongación hasta el estadio 7 donde es un tercio del tamaño total del embrión (Figura 4 F), también se puede observar la aleta caudal por primera vez (Figura 4 G). Durante el estadio 8 la aleta caudal se ensancha (Figura 4 H), y es en este punto que comienza la vascularización de la aleta (no visible en el metrial fotográfico). La cola continúa con su elongación hasta llegar al estadio 11, momento en el cual alcanza su máxima extensión (Figura 2 B; 4 E). La cola mantiene su máxima elongación hasta el estadio 13. A finales de este estadio la cola ha regresado un tercio su tamaño final (Figura 4 G) y el resto de la regresión se produce durante el estadio 14 (Figura 4 I). En el estadio 15, la cola se ha reabsorbido en su totalidad y se observa como un pequeño vestigio translúcido en las pequeñas ranas recién eclosionadas (Figura 4 L).

En *Osornophryne*, la longitud de la cola ha alcanzado dos tercios de su tamaño final en el estadio 8 y se encuentra pigmentada, también se puede observar

vascularización en la zona proximal de la cola (Figura 5 A). Como se puede observar en el estadio 11, la cola está compuesta por una raíz principal y la rodea una aleta caudal delgada, es en este estadio que la cola alcanza su longitud máxima (Figura 5 G). No se observó regresión de la cola hasta el estadio 14 (Figura 5 M).

## **5.2. EXTRACCIÓN MECÁNICA DE LAS BRANQUIAS EXTERNAS Y EFECTOS DE LA HIPÓXIA EN EMBRIONES DE *Hyloxalus nexipus***

Para comprender la relación que puede existir entre las branquias y la tolerancia que pueden tener embriones de Dendrobátidos a diferentes condiciones hipóxicas, se comparó el desarrollo embrionario de individuos con branquias e individuos sin branquias, sometidos a tres diferentes condiciones hipóxicas: normoxia (N = condiciones de oxígeno normales), hipoxia leve (HL = menor concentración de oxígeno) e hipoxia severa (HS = condiciones de oxígeno bajas) (Figura 1).

Para cuantificar las diferencias observadas durante el desarrollo de los individuos sometidos a estas diferentes condiciones, se realizaron varias mediciones morfológicas durante el primer y último día de experimentación (Anexo 1). Las medidas se tomaron antes y después de que los embriones fuesen sometidos a los diferentes tratamientos, en estadio 19 y en estadio 23, después de 5 a 7 días, con su extensión branquial máxima (Del Pino et al., 2004; Gosner, 1960).

Estas mediciones se encuentran resumidas en el Anexo 1. Se realizaron comparaciones entre las medidas iniciales y las finales (Anexo. 2; Figura. 6 A-G) y se realizó un DCA para identificar la relación que pudiesen tener los tratamientos con las variaciones morfométricas. De igual forma se realizó una prueba post hoc de significación de Tukey para observar las diferencias entre tratamientos. Varias características no morfométricas también se tomaron a consideración en el presente estudio, como la supervivencia, formación del cristalino, presencia de edema y desarrollo de aleta caudal (Figura. 6 H-K).

## 5.2.1. MORFOLOGÍA DE EMBRIONES DE *Hyloxalus nexipus* DURANTE EL DESARROLLO EN CONDICIONES HIPÓXICAS

### 5.2.1.1. ANCHO DE LA YEMA

Las mediciones morfométricas de la yema en el día final (Anexo 1) muestran que la yema tiene una tendencia a ser de mayor tamaño en embriones sometidos a hipoxia severa, no obstante, el DCA indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos en el ancho de la yema ( $p=0,984$ ) (Anexo I). De la misma manera cuando comparamos las medidas del día inicial con el día final, se puede observar una reducción del tamaño de la yema. Se observa que en los tratamientos de hipoxia severa la reducción de la yema fue menor (Anexo 2.3 y 2.6 ; Figura. 6 B; 7), sin embargo, el DCA muestra que no existen diferencias significativas en las diferentes condiciones hipoxicas ( $p=0,628$ ). No se observó diferencias entre individuos sin branquias e individuos con branquias.

### 5.2.1.2. LONGITUD TOTAL

Al comparar las mediciones de la longitud total del embrión en el día final del experimento con las medidas en el día inicial (Anexo 2), no se observaron diferencias significativas entre los embriones con branquias y los embriones sin branquias. Se puede observar que los embriones de los diferentes tratamientos poseen una tasa de crecimiento diferente, siendo los embriones en hipoxia severa los que menor tasa de crecimiento presentan (Figura. 6 A; 7). Estas diferencias probaron ser significativas entre tratamientos ( $p<0,01$ ) (Anexo 9), no obstante, la prueba de significación de Tukey muestra que no existen diferencias significativas entre los tratamientos de hipoxia leve y normoxia (Anexo 9), mientras el tratamiento de hipoxia severa muestra diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Anexo 9). Lo que sugiere que la hipoxia severa está influenciando negativamente en la tasa de crecimiento de los embriones

### **5.2.1.3. ANCHO DE LA COLA**

Al analizar el ancho de la cola se puede observar que los embriones en hipoxia severa muestran una tasa de crecimiento muy distinta al resto de tratamientos (Anexo 2.3 y 2.6) (Figura. 6 D), el DCA mostró que en efecto existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,01$ ), y la prueba de Tukey mostró que existen diferencias significativas entre los tratamientos de hipoxia severa con los otros tratamientos (Hipoxia leve y normoxia) (Anexo 10). No se observaron diferencias significativas entre los individuos cortados las branquias y los individuos con branquias.

### **5.2.1.4. ANCHO DE LA CABEZA**

El crecimiento de la cabeza muestra diferencias significativas bajo condiciones hipoxicas (Anexo 2.2, 2.3, 2.5 y 2.6). Se observó que el ancho de la cabeza en embriones bajo hipoxia severa presenta una tasa de crecimiento menor que los embriones sometidos a hipoxia leve y normoxia (Figura. 6 C; 7). El DCA muestra diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,01$ ) y se observa en la prueba de Tukey que hay diferencias significativas del tratamiento de hipoxia severa con el resto de los tratamientos (Anexo 11). No se observa diferencias significativas entre los individuos sin branquias y los individuos con branquias.

### **5.2.1.5. LONGITUD CUERPO-COLA.**

Se realizaron mediciones conjuntas de la longitud del cuerpo y la cola durante el primer y último día de experimentación (Anexo 1; Figura. 6 G). El ANOVA ayudó a identificar diferencias significativas en la longitud del cuerpo y la cola bajo las diferentes condiciones de oxígeno ( $p < 0,01$ ), la prueba de Tukey mostro que no hay diferencias significativas entre individuos con branquias cortadas e individuos con branquias intactas, pero si se observa diferencias significativas entre embriones bajo hipoxia severa y el resto de embriones (Anexo 12).

#### **5.2.1.6. LONGITUD BRANQUIAS EXTERNAS ANTERIORES**

Las diferencias entre los individuos cortados las branquias e individuos sin cortar son evidentes a simple vista. Las branquias de individuos con branquias exhiben ramificaciones (Figura 6 E; 7 A-C, G), mientras los individuos con sus branquias extirpadas muestran regeneración parcial de las branquias (Figura. 7 D-F, Figura. 6 F). El DCA muestra que existen diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,01$ ), la prueba de Tukey indica que no existen diferencias significativas en la longitud de las branquias externas de embriones con branquias sometidos a hipoxia leve y normoxia, mientras que se observan diferencias significativas en la longitud de las branquias en hipoxia severa en relación con los otros tratamientos (Anexo 13). Las diferencias en las morfometrías del día inicial y el día final se resumen en el Anexo 2.

#### **5.2.2. SUPERVIVENCIA.**

En el transcurso de la experimentación se reportó mortalidad de los embriones, de forma que análisis en la supervivencia de los embriones indican que hay mayor mortalidad en los embriones sometidos a hipoxia severa (Anexo 3; Figura. 6 H). El DCA indica diferencias significativas en la mortalidad de los embriones correspondientes a las diferentes condiciones de oxígeno ( $p < 0,01$ ), la prueba de Tukey mostro que existe mayor mortalidad en los individuos que están sometidos a hipoxia severa, mientras no se observó diferencias significativas en la mortalidad de los embriones bajo normoxia e hipoxia leve (Anexo 14).

#### **5.2.3. FORMACIÓN DEL CRISTALINO**

Una de las características que se pudo observar a lo largo de la experimentación fue que algunos embriones no desarrollaban el cristalino en las

vesículas ópticas, o no desarrollaban las vesículas ópticas del todo (Anexo 4; Figura 6 J; 7 C, F), el ANOVA mostró que si existen diferencias significativas en la formación de cristalino en los tratamientos ( $p < 0,01$ ). La prueba de Tukey nos indica que la formación de cristalino es igual en los embriones bajo normoxia e hipoxia leve, ya que no se observan diferencias significativas entre estos grupos. Si se observa diferencias significativas de los individuos en hipoxia severa con el resto de los embriones y no se observa diferencias entre embriones con branquias e individuos con branquias extirpadas (Anexo 15).

#### **5.2.4. PRESENCIA DE EDEMAS.**

En el transcurso de la experimentación se pudo presenciar la formación de edemas en varios embriones, a excepción de los embriones de normoxia con branquias e hipoxia leve con branquias (Anexo 5; Figura 6 I). Sin embargo, el ANOVA muestra que no existen diferencias significativas en la formación de edema en ninguno de los tratamientos (Anexo 16).

#### **5.2.5. DESARROLLO DE LA ALETA CAUDAL**

Una de las características que se pudo identificar y que se observaba mayoritariamente en los individuos sometidos a hipoxia severa, fue la ausencia de la aleta alrededor de la cola (Anexo 6; Figura. 6 K). El ANOVA indica que la presencia de aleta en embriones con hipoxia leve y normoxia es mayor, mientras que la ausencia de aleta es significativa en embriones bajo hipoxia severa (Anexo 17).

### 5.2.6. EXTRACCIÓN MECÁNICA DE LAS BRANQUIAS EXTERNAS Y EFECTOS DE LA HIPÓXIA EN *Hyloxalus elachyhistus*.

Para ver el efecto que tienen la extracción de branquias y los ambientes hipóxicos, en otras especies de denrobátidos, se realizaron los mismos experimentos en embriones de *Hyloxalus elachyhistus*. Los embriones de *H. elachyhistus* fueron sometidos a las mismas condiciones de oxigenación: normoxia, hipoxia leve, e hipoxia severa, de igual manera las experimentaciones se realizaron en individuos con branquias y en individuos con branquias extirpadas (Figura 1). Si bien el número de muestra no nos permite realizar análisis estadísticos, existen características morfológicas que vale la pena mencionar, debido a su semejanza con lo observado en *H. nexipus*,

Dentro de las características semejantes que se pudieron observar fueron: la diferente tasa de mortalidad, con fuerte tendencia a mayor mortalidad de los individuos en hipoxia severa, la ausencia de cristalino en condiciones de hipoxia severa (Figura 8 C, F), mayor tamaño en individuos bajo condiciones de normoxia e hipoxia leve (Figura 8 A, B, D, E), retraso en el desarrollo de embriones bajo hipoxia y regeneración de branquias, en embriones con las branquias externas extraídas mecánicamente (Figura 8 D-F).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. DESARROLLO DIRECTO

En este estudio se describe y compara el desarrollo embrionario de *Noblella* sp., *Noblella* aff. *heyeri* (Craugastoridae) y *Osornophryne occidentalis* (Bufonidae) (Tabla 1). El desarrollo de las tres especies fue dividido en 15 estadios, para facilitar la descripción de desarrollo embrionario. La descripción del desarrollo de las tres especies muestra los cambios morfológicos externos que atraviesan los embriones durante su desarrollo, permitiendo la comparación con las tablas previamente descritas para *Eleutherodactylus coqui* (Townsend & Stewart, 1985), *Adelophryne maranguapensis* (De Lima et al., 2016), y *Arthroleptis* (Schweiger et al., 2017). El presente análisis comparativo del desarrollo de *Noblella* sp., *N.aff. heyeri* y *O. occidentalis* con otras especies de anuros, permitió evidenciar las variaciones que presentan estas especies a lo largo de su desarrollo, lo que se sugiere que estas modificaciones son consecuencia de su modo reproductivo.

El presente estudio muestra las primeras descripciones del desarrollo directo en ranas pertenecientes a estos géneros, por lo cual es un aporte al conocimiento sobre los anuros presentes en nuestro país y a los estudios comparativos de embriogénesis que se realizan en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

#### 6.1.1. EL DESARROLLO TEMPRANO DE *Noblella* sp., *Noblella* aff. *heyeri* y *Osornophryne occidentalis*

Los embriones de *Noblella* sp. fueron analizados desde el estadio 5; sin embargo, no se obtuvieron embriones en los estadios más tempranos debido a la carencia de nidos. En el caso de *Noblella* aff. *heyeri*, se analizaron dos nidos, uno se encontraba en estadio 5 y después de 48 horas de observación, se lo determinó como muerto. El otro nido tenía embriones en estadio 11, momento desde el cual se siguió

su desarrollo hasta el estadio 14. Debido a la contaminación del nido con hongos no fue posible evidenciar el estadio 15 y la eclosión.

En el estadio 5 se pudo observar características similares en ambas especies de *Noblella* (Figura 2; 3 B-D), la presencia de dos regiones en la cabeza (óptica y ótica), las yemas de las extremidades unidas a los extremos del tubo neural y la formación de la cola, similar a lo observado en *Eleutherodactylus coqui* (Townsend y Stewart, 1985). La pigmentación de los embriones de estas especies varía durante este estadio. *Noblella* sp. es la especie que mostraba mayor cantidad de melanóforos y la presencia del disco de pigmento (Figura 3 B, D), similar a lo observado en *A. maranguapensis* (De Lima et al., 2016). Los embriones de *Noblella* aff. *heyeri* no mostraban pigmentación durante este estadio (Figura 2 A), semejante a *E. coqui* y *Arthroleptis* (Schweiger et al., 2017; Townsend y Stewart, 1985) A diferencia de *E. coqui*, no se observó la presencia de branquias durante este estadio. Similar a lo observado a en *A. maranguapensis*, *Noblella* sp. es la única especie de las revisadas, en la cual los depósitos de calcio endolinfáticos están presentes durante este estadio, sin embargo en *Philautus viridis* (Bahir et al, 2005), se los observa tempranamente, en el estadio 3.

Durante el estadio 6, en *E. coqui* se observa la aparición del pigmento en el cuerpo y la formación del disco de pigmento, en *Noblella* sp., el disco del pigmento está bien diferenciado y se encuentra en expansión; también se observa melanóforos distribuidos a lo largo del tronco y la cabeza (Figura 3 E). En *E. coqui*, *Platymantis vitiana* (Narayan et al., 2011) y en *Metacrinia nichollsii* (Anstis, 2008), en este estadio los ojos están bien diferenciados, poseen una pupila clara y el iris gris, en *Noblella* sp. no se evidencia aún vesículas ópticas y en *A. maranguapensis* las vesículas ópticas son evidentes pero carecen aún de color. Todas las especies revisadas muestran una cola con una aleta fina y flexión de la región media del embrión, de igual forma ya todas las especies presentan DCE.

En el transcurso del estadio 7, *Noblella* sp. (Figura 3 F-G) muestra ciertas similitudes con *Arthroleptis* y *E. coqui*. Se observa en las extremidades inferiores las constricciones que darán lugar a la articulación de la rodilla, también se puede ver el

inicio de la formación del autopodio. Estas características también las comparten con *M. nichollsii* y *A. maranguapensis*. Otras similitudes en este estadio son, vascularización de la aleta caudal y expansión de la cobertura secundaria (pared del cuerpo). A diferencia de *E. coqui*, que presenta branquias externas con circulación, *Noblella* sp., *M. nichollsii*, *A. maranguapensis*, *Platymantis vitiana* y *Arthroleptis*, no presentan branquias externas. En este estadio en *Noblella* sp. se puede observar la formación de las vesículas ópticas, aún despigmentadas (Figura 3 G).

Durante el estadio 8, en *Noblella* sp., se puede identificar los ojos por primera vez, con pigmentación parcial del iris, de color grisáceo y pupila translúcida (Figura 3 H-I). Estas características aparecen en estadios anteriores en otras especies. El nido de *Osornophryne occidentalis* (Figura 5) fue encontrado en este estadio embrionario, el color del iris y la pupila son semejantes a *Noblella* sp., durante este estadio (Figura 5 A). Otras características semejantes en este estadio son: expansión de la cobertura secundaria, expansión de las extremidades posteriores y el movimiento de la cola. Para este estadio *E. coqui* inicia la regresión de sus branquias externas, característica que no fue observable en *Noblella* y tampoco en *O. occidentalis*. Las branquias externas en el clado Terrarana no han sido observadas en la familia Brachycephalidae y tampoco en Craugastoridae, esta característica solo ha sido observada ampliamente lo largo de la familia Eleutherodactylidae (Goldberg & Candiotti, 2015). En *M. nichollsii* y *Arthroleptis*, las extremidades anteriores se encuentran cubiertas por el opérculo, semejante a lo observado en *Osornophryne occidentalis* (Figura 5 A), en *Noblella* sp., las extremidades anteriores están libres y ya se puede diferenciar el estilopodio y zeugopodio (Figura 3 H-I).

Durante el estadio 9 en *Noblella* sp. (Figura 3 J-L), se puede observar el desarrollo de los ojos y el oscurecimiento del iris (Figura 3 J, K), semejante a *A. maranguapensis*, *M. nichollsii*, *E. coqui*, *Philautus cf leucorhinus* (Gururaja y Ramachandra, 2006). Estas estructuras en *O. occidentalis* aparecen en el estadio anterior. Las extremidades anteriores en *O. occidentalis* siguen desarrollándose dentro del opérculo (Figura 5 C), semejante a lo observado en *Arthroleptis* y *M. nichollsii*. En las extremidades posteriores *O. occidentalis* y en ambas extremidades de *Noblella*, se

puede observar la formación de rudimentos digitales en el autopodio; estos rudimentos digitales están altamente vascularizados (Figura 3 L; 5 D). La diferenciación de estas estructuras y su vascularización es consistente con lo observado en otros anuros del clado Terrarana (Anstis, 2008; Bahir et al., 2005a; Goldberg y Candiotti, 2015; Gururaja y Ramachandra, 2006; Nokhbatolfoghahai et al., 2010; Schweiger et al., 2017; Townsend y Stewart, 1985). La extensión de los DCE es semejante y la longitud de la cola de igual manera es un tercio de su tamaño final en la mayoría de especies a excepción de *M. nichollsii* que ha alcanzado la máxima extensión de su cola en el estadio 8 (Anstis, 2008).

### **6.1.2. EL DESARROLLO TARDÍO DE *Noblella* y *Osornophryne occidentalis*.**

A partir del estadio 10, en *Noblella*, la cobertura secundaria se ha expandido, englobando la yema (Figura 4 A) Se observa algo similar en *E. coqui* y *M. nichollsii*, donde la cobertura secundaria cubre dos tercios de la yema (Antis, 2008; Townsend y Stewart, 1985). Mientras, en *Osornophryne occidentalis*, la cobertura secundaria está por cerrarse completamente, dejando solo la línea media del embrión descubierta (Figura 5 E). Estudios en *A. maranguapensis*, han mostrado la alta presencia de células ciliadas en la cobertura secundaria durante este estadio (de Lima et al., 2016), estas células serían las principales responsables en la expansión de la pared del cuerpo.

La cola en *Noblella* sp. y *O. occidentalis* sigue sin alcanzar su máxima extensión, la aleta caudal es ancha y altamente vascularizada (Figura 4 A; 5 E). Esta característica es similar en *Arthroleptis* y opuesto a lo observado en *E. coqui*, *Philautus* y *A. maranguapensis*, especies que muestran una cola totalmente desarrollada y una aleta fina. Durante este estadio las extremidades anteriores de *O. occidentalis* se exponen y se puede identificar estilopodio, zeugopodio y autopodio, semejante a los desarrolladores directos del género *Arthroleptis*.

Los embriones del nido de *Noblella* aff. *heyeri* se encontraron en estadio 11, con su cola totalmente desarrollada (Figura 2 B), semejante a lo observado en *Noblella* sp. y *O. occidentalis*. En estas especies durante este estadio, la cola dirige los movimientos del embrión, semejante a lo observado en otros desarrolladores directos como *E. coqui*, *A. maranguapensis*, *Philautus*, *Arthroleptis* y *Haddadus binotatus* (Goldberg y Candiotti, 2015). En las dos especies de *Noblella* existe diferenciación de los dígitos, aunque aún no se han elongado por completo (Figura 2 C; 3 E). En *O. occidentalis* los dígitos aún permanecen sin diferenciación, sin embargo, se observa elongación del autopodio (Figura 5 H). La pigmentación en las tres especies es diferente, *Noblella* sp. tiene mayor cantidad de melanóforos en la superficie del embrión durante este estadio (Figura 4 D), *Noblella* aff. *heyeri* solo presenta pigmento en la parte dorsal del embrión y se observa unos pocos melanóforos distribuidos en la zona abdominal (Figura 2 B). *Osornophryne* también tiene melanóforos distribuidos por todo el embrión, pero se encuentran mayormente concentrados en la región dorsal (Figura 5 G).

Durante el estadio 12, las dos especies de *Noblella* poseen varias semejanzas con *E. coqui*. La cobertura secundaria ha englobado prácticamente todo el embrión, a excepción de la línea media (Figura 2 D; 4 F). En *O. occidentalis*, durante este estadio se cierra por completo la cobertura secundaria, pero la reserva de yema aun es grande (Figura 5 J). En las tres especies la cola continúa teniendo su máxima extensión, característica que varía en otras especies durante este estadio, *A. maranguapensis*, durante este estadio, recién alcanza la extensión total de la cola. En *Arthroleptis* en cambio, se observa que la cola ha iniciado su regresión. Otras características semejantes con *E. coqui* son: la coloración oscura del iris y clara de la pupila, las extremidades miden dos tercios de su tamaño final, existe movimiento independiente de las extremidades, los dígitos están completamente diferenciados en ambas especies de *Noblella*, en *Osornophryne* siguen sin diferenciarse los rudimentos digitales. El dígito tres (rudimento digital tres, en *O. occidentalis*) es el más elongado (Figura 2 E; 5 I). Estas tres últimas características son compartidas con todos los desarrolladores directos durante este estadio. La configuración de los DCE es diferente entre varias especies. En *E. coqui*, se ha observado que en este estadio los DCE

alcanzan su máxima elongación, formando un cuerpo central con filamentos que llegan a la zona posterior de los ojos y son enmascarados parcialmente por pigmento. *O. occidentalis* y *Noblella* al igual que *Philautus*, tienen los DCE cubiertos por completo en este estadio.

En el transcurso del estadio 13 las extremidades de *E. coqui* alcanzan su máxima longitud y las almohadillas en los dígitos son observables (Townsend y Stewart, 1985). En *Noblella aff. heyeri*, *Noblella* sp. y *O. occidentalis*, las extremidades aún no muestran su máxima extensión. Los dígitos en las dos especies de *Noblella* continúan elongándose, pero aún no presentan almohadillas (Figura 2 G; 4 G). En *Osornophryne occidentalis* el autopodio aún presenta rudimentos digitales que se encuentran en elongación y tampoco se evidencia almohadillas (Figura 5 K). Otra de las características que difieren *Noblella aff. heyeri*, *Noblella* sp. y *O. occidentalis* de *E. coqui* durante este estadio es la regresión de la cola, *E. coqui* ha iniciado ya la regresión de la cola, por su parte las dos especies de *Noblella* y *Osornophryne occidentalis* aún poseen máxima elongación caudal. Otros anuros como *Haddadus binotatus* y *Adelophryne maranguapensis* aún no han alcanzado el máximo desarrollo de la cola. Semejante a *E. coqui*, en *Noblella aff. heyeri*, *Noblella* sp. y *O. occidentalis* los movimientos son guiados principalmente por las extremidades inferiores, que son flexionadas constantemente, aunque aún no están desarrolladas completamente. En ambas especies de *Noblella* los ECD ya no son visibles, mientras que en *E. coqui* aún se pueden observar ligeramente. En *O. occidentalis* los ECD no son visibles desde estadios previos. En todos los desarrolladores directos el pigmento ya se ha distribuido por todo el cuerpo.

*Noblella aff. heyeri* y *Noblella* sp. durante el estadio 14 han cerrado la cobertura secundaria por completo y aún poseen reserva de yema (Figura 2 H; 4 I). En *O. occidentalis* la cantidad de yema ha disminuido de tamaño (Figura 5 M), mientras en *E. coqui*, la reserva de yema aún es prominente, y la cobertura secundaria se ha cerrado completamente. Tanto *O. occidentalis*, como las dos especies de *Noblella*, han finalizado la pigmentación de los ojos y es semejante a la de los adultos (Figura 2 H; 4 J; 5 N), y la pigmentación del cuerpo está cerca de finalizar. La cola también ha

iniciado su regresión en *Noblella* sp. (Figura 4 I), en *Noblella* aff. *heyeri* y *O. occidentalis* la cola aún conserva su longitud máxima (Figura 2 H; 5 M). Los movimientos del embrión son dirigidos por completo por las extremidades en todos los desarrolladores directos y las extremidades han alcanzado su máximo desarrollo en *Noblella* y *O. occidentalis*, durante el estadio 14 (Figura 2 H; 4 I; 5 M). Los dígitos en *Noblella* ya se asemejan a los adultos, se han elongado por completo y las almohadillas ya están presentes (Figura 2 I). En *Osornophryne* los dígitos siguen sin diferenciarse, sin embargo, muestran semejanza a los dígitos de los adultos, por lo cual se asume que su diferenciación ha finalizado (Figura 5 N).

Lamentablemente por contaminación de hongos en los nidos de *Noblella* aff. *heyeri* y *Osornophryne occidentalis* no fue posible evidenciar el estadio 15. *Noblella* sp. durante este estadio ya es semejante a un adulto, sus extremidades están totalmente pigmentadas y su patrón dorsal es similar al observado en adultos. Como se detalla también en *E. coqui*, la cola ha regresado y solo se observa una pequeña prolongación transparente en la región caudal. En este punto los embriones ya pueden moverse libremente y son capaces de saltar. Observaciones posteriores no fueron posibles debido a la muerte de los embriones de *Noblella* sp., después de 816 horas de observación aproximadamente.

### **6.1.3. *Noblella* aff. *heyeri*, *Noblella* sp. Y *Osornophryne occidentalis* EN RELACIÓN CON OTROS DESARROLLADORES DIRECTOS.**

El desarrollo directo se encuentra en los tres grupos principales de anfibios, y representa la ausencia de un desarrollo bifásico con una larva de vida libre de la ontogenia (Schweiger et al., 2017). El desarrollo directo ha evolucionado más de 10 veces independientemente en los anuros y ha aparecido más de una vez en ciertos linajes (Goldberg, 2012). En el clado Terrarana (Brachycephaloidea) el desarrollo directo tiene una amplia radiación, encontrándose en más de mil especies y considerándose una sinapomorfía dentro de este clado monofilético de ranas desarrolladoras directas del nuevo mundo (Goldberg & Candiotti, 2015). Es así, que,

en 1985, Townsend y Stewart crean la tabla de desarrollo directo basada en sus observaciones de *Eleutherodactylus coqui* y otros representantes de la familia *Eleutherodactylidae*. Esta tabla de estadios sigue siendo ampliamente utilizada hasta el presente, tanto en *Eleutherodactylidae* como en anuros fuera del clado de los Terraranos (Schweiger et al., 2017); sin embargo, estudios posteriores mostraron que existen variaciones en la aparición de branquias extraembrionarias, tiempo y diferenciación de las extremidades, y configuración de la cola (Goldberg y Candiotti, 2015). De igual manera, varias diferencias con *E. coqui* pudieron observarse en los embriones de *Osornophryne* y *Noblella*. Identificar estas variaciones es un aporte en el descubrimiento de las dinámicas de la reproducción terrestre endotrófica.

#### 6.1.4. COBERTURA SECUNDARIA

Durante el desarrollo temprano *Noblella* ya tiene su disco de pigmento formado a finales del estadio 6 (Figura 3 E), Este disco va progresando mientras el desarrollo avanza, y para el estadio 12, la cobertura secundaria ya ocupa toda la región dorsal del embrión, pero la reserva de yema aún está expuesta en la línea media del embrión (Figura 4 A-C). En *E. coqui*, el disco de pigmento se forma durante el estadio 7 y para el estadio 12 la cobertura secundaria se ha cerrado por completo, pero la reserva de yema aun es abundante (Townsend y Stewart, 1985). El cierre de la cobertura secundaria con una reserva abundante de yema es una característica que también presenta *O. occidentalis*, durante el estadio 12 (Figura 5 J); sin embargo, la descripción de la formación del disco de pigmento en estadios tempranos no se encuentra disponible, debido a la poca disponibilidad de los nidos. Lo más temprano que se pudo detallar la progresión de la cobertura secundaria en *O. occidentalis* fue en el estadio 8, donde se podía observar que la cobertura secundaria ocupaba la parte dorsal del embrión, mientras la yema seguía expuesta (Figura 5 A).

El cierre de la cobertura secundaria ha mostrado ser una característica variable dentro de los desarrolladores directos. Por ejemplo, en terraranos como *Arthroleptis*, la cobertura secundaria rodea al embrión por completo a finales del estadio 10 u 11

(Schweiger et al., 2017). En Craugastóridos, como *Haddadus binotatus* y *Oreobates barituensis*, el pigmento se encuentra con la línea media del embrión en estadios tardíos, o eclosionan sin cerrarse la cobertura secundaria (Goldberg & Candiotti, 2015; Goldberg et al., 2012). En *Noblella* sp., la cobertura secundaria cubrió la yema por completo, durante el estadio 14 (Figura 4 I) después de aproximadamente 618 horas de observación.

### **6.1.5. PROGRESIÓN DE LAS EXTREMIDADES Y FORMACIÓN DE DIGITOS.**

Las yemas de las extremidades aparecen tempranamente en el desarrollo de *E. coqui* y otros miembros de Eleutherodactylidae. Durante el estadio 4, las yemas se pueden observar como hinchazones redondeadas separadas del tubo neural (Townsend y Stewart, 1985). En *Noblella* las yemas de las extremidades se pueden apreciar durante el estadio 5 como cuatro pequeños cuerpos blancos ovoidales, unidos a los extremos del tubo neural, también se observa mayor elongación de las yemas posteriores (Figura 2 A; 3 B). Estas características son similares en todos los desarrolladores directos observados hasta el presente (Anstis, 2008; Bahir et al., 2005; de Lima et al., 2016; Goldberg y Candiotti, 2015; Goldberg et al., 2012; Schweiger et al., 2017; Townsend y Stewart, 1985)

A partir del estadio 6 se observan variaciones en el desarrollo de las extremidades superiores en especies que no pertenecen a Eleutherodactylidae, pero pertenecientes a Terrarana como *Adelophryne maranguapensis* (Eleutherodactylidae), y especies no Terrarranas como *Arthroleptis* (Arthroleptidae) y *Metacrinia nichollsii* (Myobatrachidae). En estas especies se ha observado que las yemas anteriores empiezan a ser cubiertas por el opérculo, y se desarrollan dentro de este hasta aproximadamente el estadio 10 (St 11 en *Metacrinia nichollsii*), momento en el cual son visibles en el exterior y ya se diferencian las extremidades (Anstis, 2008; de Lima et al., 2016; Schweiger et al., 2017). En *O. occidentalis* durante el estadio 8 las extremidades superiores se encuentran dentro del opérculo (Figura 5 A, B) y son

liberadas en el estadio 10 (Figura 5E, F). Algo semejante es observable en la morfología de *Nectophrynoides malcolmi* (Bufonidae) (Wake, 1980). Estas semejanzas con *Arthroleptis* y *Metacrinia* supondrían similitudes en etapas tempranas del desarrollo, especialmente en la cobertura de las yemas anteriores por el pliegue opercular, sin embargo, más estudios en el desarrollo temprano de *O. occidentalis* necesitan ser realizados.

Las dos especies de *Noblella* por su parte han tenido un desarrollo de las extremidades semejante a lo observado en otros Terraranos como *E. coqui* y *H. binotatus*, las cuatro yemas de las extremidades son libres y se van elongando conforme progresan en el desarrollo; para el estadio 10, las yemas se diferencian en extremidades y los dígitos se han diferenciado (Goldberg y Candiotti, 2015; Goldberg et al., 2012; Townsend y Stewart, 1985). *Osornophryne occidentalis* no muestra diferenciación de los dígitos en ningún punto del desarrollo. Esto puede estar relacionado a la morfología de las patas en los adultos, con los dígitos unidos por una membrana gruesa. Los dígitos 3 y 4 de las extremidades superiores son observables, mientras en las extremidades inferiores solo se distingue claramente el dígito 4 (Ron et al., 2018). A partir del estadio 11 en adelante todos los desarrolladores directos se semejan en la sincronía de la elongación y pigmentación de las extremidades hasta la eclosión.

#### **6.1.6. DIENTE EMBRIONARIO**

Existen características que se han observado exclusivamente dentro de Terrarana como lo es la presencia del diente embrionario. En primera instancia, el diente embrionario es una estructura que no se ha observado en ranas no terraranas (Anstis, 2008; Bahir et al., 2005; Schweiger et al., 2017; Townsend y Stewart, 1985), en *Osornophryne occidentalis* tampoco se pudo presenciar esta estructura. El diente embrionario en las dos especies de *Noblella* fue evidente por primera vez en el estadio 12 (Figura 2 E) y se observa completamente desarrollado en el estadio 14, como una estructura monocúspide de coloración negra en el medio de la maxila superior (Figura

2 G; 4 K). En *E. coqui*, es una estructura monocúspide y también ha alcanzado su desarrollo total en este estadio. Se ha observado dientes embrionarios con estructura bicúspide en otros miembros de la familia Eleutherodactylidae (Townsend y Stewart, 1985).

#### **6.1.7. BRANQUIAS EXTERNAS**

En los estudios realizados en desarrolladores directos del clado Terrarana, se ha observado que las branquias externas se encuentran presentes exclusivamente en miembros de la familia Eleutherodactylidae (Townsend & Stewart, 1985). Estudios en otros terraranos pertenecientes a la familia Craugastoridae, reportaron la ausencia de branquias externas (Goldberg & Candiotti, 2015; Goldberg et al., 2012), al igual que otras especies de desarrolladores directos no Terraranos. En el presente estudio no se observó en ningún punto del desarrollo de *Noblella* sp., *Noblella* aff. *heyeri* y *Osornophryne occidentalis* la presencia de branquias externas, lo que corrobora la afirmación de que esta característica es exclusiva de la familia Eleutherodactylidae.

#### **6.1.8. DESARROLLO DE LA COLA Y LA ALETA CAUDAL.**

Varios autores han hipotetizado la funcionalidad respiratoria que puede poseer la cola. Su estructura con varios pliegues de epitelio semejante al de las branquias y una alta vascularización, la convierten en una superficie adecuada para el intercambio gaseoso, especialmente en especies que carecen de branquias (Goldberg y Candiotti, 2015; Nokhbatolfoghahai et al., 2010; Townsend y Stewart, 1985).

Tres aspectos son importantes en la cola de los anuros de Terrarana, la rotación del eje, el origen y extensión de las aletas caudales. En la mayoría de especies de Eleutherodactylidae la cola se encuentra doblada en dirección derecha o izquierda y se posiciona en el huevo dorso-ventralmente alineada al eje dorsoventral (Goldberg & Candiotti, 2015), como se ha observado en *E. coqui*, *E. nubicola*, *E. anti*, *A. maranguapensis*, *Pristimantis urichi* (de Lima et al., 2016; Mohsen Nokhbatolfoghahai et al., 2010; Townsend & Stewart, 1985). Esto también es apreciable en los embriones

de *Noblella* (Figura 2 D; 4 A, D, E, F). De igual forma se puede observar que la aleta dorsal se extiende más que la ventral, esto también puede ser apreciado en no Terraranos como *Osornophryne occidentalis* (Figura 5 A, G, I).

Observaciones en varios Craugastóridos han mostrado variaciones en la disposición espacial de la cola con respecto al eje, debido al espacio que debe ocupar el embrión dentro del huevo; sin embargo, observaciones en *Haddadus binotatus* y *Oreobates barituensis* sugieren que el cambio de la disposición de la aleta caudal de dorsoventral a lateral puede generar diferentes variaciones como, aletas con diferentes extensiones (*Haddadus binotatus*), aletas laterales simétricas como en el caso de las dos especies de *Noblella* (Figura 2 H; 4 G), aletas laterales asimétricas, entre otras variaciones (Goldberg y Candiotti, 2015).

En la familia Bufonidae no se han realizado descripciones a profundidad de la cola, sin embargo, se puede denotar que *O. occidentalis*, a diferencia de los craugastóridos, presenta una cola con una raíz muy gruesa en disposición lateral. Las aletas son mucho más delgadas que las observadas en cualquier miembro de Craugastoridae (Figura 5 G, I, M) (Goldberg y Candiotti, 2015; Goldberg et al., 2012; Nokhbatolfoghahai et al., 2010).

## 6.2. HIPÓXIA EN EL DESARROLLO

La semejanza presente en las características morfológicas de los embriones sometidos a hipoxia leve y normoxia, y la tasa de supervivencia de embriones en hipoxia severa, indican que los embriones de *Hyloxalus nexipus* presentan cierto grado de tolerancia a la hipoxia. Esto va de la mano con las observaciones en ectotermos (reptiles anfibios y peces) donde se ha denotado la alta capacidad que poseen estos animales para sobrevivir a condiciones de hipoxia durante periodos prolongados de tiempo. Dentro de los ectotermos, los anfibios tienen una tolerancia a la anoxia intermedia entre la observada en mamíferos y reptiles (Bickler y Buck, 2007). Los embriones de *Hyloxalus nexipus* e *Hyloxalus elachyhistus* estuvieron sometidos a hipoxia por seis días aproximadamente.

Estudios del efecto de las condiciones de oxígeno en embriones de anuros han sido realizados previamente en miembros de la familia Hylidae. Estos estudios buscan en su mayoría comprender la plasticidad de la eclosión en *Agalychnis callidryas* (Downie et al., 2013; Rogge y Warkentin, 2008; Touchon y Warkentin, 2008; Warkentin, 2007). Detalles importantes han podido observarse en los embriones de *Agalychnis callidryas*: la hipoxia es uno de los factores que influyen la eclosión temprana, existe alta mortalidad en condiciones hipoxicas y el desarrollo embrionario se ralentiza (Rogge y Warkentin, 2008). Se pudo observar algo similar en los embriones de *Phyllomedusa trinitatis*, donde la falta de oxígeno en embriones sumergidos en diferentes líquidos salinos provoca eclosión temprana, malformaciones y retrasos en el desarrollo (Downie et al., 2013). Observaciones en campo, de *Dendropsophus ebraccatus*, mostraron que los nidos sumergidos en agua tenían una buena tasa de desarrollo, sin embargo, conforme bajaban en la columna de agua, problemas en su desarrollo fueron evidentes, como malformaciones y retraso en el desarrollo, e incluso mortalidad en embriones que se encontraban muy por debajo de la superficie (Touchon & Warkentin, 2008).

Estas características también son semejantes en los embriones de *Hyloxalus nexipus*, donde las diferencias significativas en el crecimiento (longitud total, ancho de la cabeza, ancho de la cola, etc.) de los embriones sometidos a hipoxia y la ausencia del desarrollo del cristalino, son señales claras de que ha existido un retraso en el desarrollo (Figura 7 C, F). Por otra parte, el desarrollo normal de los embriones sometidos a hipoxia leve es una muestra de que existe plasticidad en la tolerancia a la hipoxia (Figura 7 B, E), como se ha observado en las diferentes especies de la familia Hylidae. La presencia de características similares en *Hyloxalus elachyistus* sugiere que la plasticidad de la tolerancia a condiciones variables de oxígeno puede presentarse en otras especies de dendrobátidos, debido a que todas las especies de la familia comparten el mismo modo reproductivo y las condiciones naturales a las que se enfrentan los nidos son similares.

### 6.3. LAS BRANQUIAS EXTERNAS DE *Hyloxalus nexipus*

Las branquias son evaginaciones permeables que crecen en la superficie del cuerpo, varían en su estructura y configuración conforme los organismos se vuelven más complejos: existen branquias tan complejas como las observadas en peces y crustáceos, como también existen branquias externas simples como las que se observan en embriones de anuros y larvas de teleósteos (Maina, 2002). En anfibios, las branquias externas y los arcos branquiales presentan las tres capas embrionarias. El ectodermo recubre las branquias, el mesodermo tiene los vasos sanguíneos, y los arcos y hendiduras están recubiertos por endodermo (Harrison, 1921).

Las branquias externas de dendrobátidos presentan una forma simple: en estadio 19 se las diferencia como pequeñas yemas a los lados del cráneo (Gosner & Rossman, 1960) y cuando han llegado a estadio 23, presentan su máxima extensión branquial y se las puede denotar como un filamento principal altamente vascularizado del cual salen varias ramificaciones (Figura 7 A, G; 8 A, G). En estadios posteriores las branquias son cubiertas por el opérculo y para la eclosión han regresado completamente (Del Pino et al., 2004). Varios estudios han buscado entender la funcionalidad de las branquias externas. Se ha observado que en especies con eclosión temprana, las branquias son útiles durante los primeros estadios post-eclosión, mientras en especies con eclosión retardada, las branquias son estructuras transitorias y su utilidad se limita a las constricciones del huevo (Nokhbatolfoghahai et al., 2013).

Estudios en *Agalychnis callidryas* (Rogge y Warkentin, 2008), mostraron que las branquias son importantes en el tiempo de eclosión. Es así que, embriones de *A. callidryas* sin branquias eclosionan más rápido que individuos con branquias. La regresión branquial en este estudio fue mediada por condiciones hiperoxicas. Otros estudios de la morfología y estructura branquial (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2008; Nokhbatolfoghahai et al., 2013) indicaron la existencia de tejido muscular en las branquias, e hipotetizaron que los movimientos que pueden observarse ayudan a mejorar la perfusión de los embriones. El presente estudio buscó observar la

funcionalidad de las branquias durante el desarrollo en condiciones hipóxicas, de igual forma que Rogge y Warkentin, se comparó individuos con branquias y sin branquias, sin embargo, los embriones sin branquias fueron producto de la remoción mecánica de las mismas, y no por inducciones a la regresión branquial ya sea por hiperoxia o por administración de misoprostol (Warkentin y Wassersug, 2001; Warkentin, 2002).

Al comparar la tasa de crecimiento de los embriones de *H. nexipus* con branquias y embriones sin branquias bajo distintas concentraciones de oxígeno, se puede observar diferencias claras entre las condiciones de hipoxia severa y el resto de tratamientos, pero no se observa diferencias significativas en el desarrollo de embriones intactos y embriones cortados las branquias. Esta característica también ha sido observada previamente en *Amblistoma punctatum* donde, después de la extracción branquial, algunos individuos tuvieron un desarrollo normal bajo eventos de normoxia e incluso presentaron crecimiento del tejido branquial extirpado; sin embargo, algunos individuos no presentaban circulación sanguínea en las branquias (Harrison, 1921). A diferencia de *A. punctatum*, los embriones de las dos especies de *Hyloxalus*, presentaron crecimiento del tejido branquial estirpado y circulación sanguínea en los filamentos branquiales, a excepción de los individuos que se encontraban bajo hipoxia severa (Figura. 7 D-F; 8 D-F). Al comparar la longitud de las branquias de embriones cuyas branquias fueron cortadas, de los que sus branquias se dejaron intactas, no se encuentran diferencias significativas. Esto se debe a que los filamentos branquiales eran capaces de alcanzar una longitud similar a la de las branquias normales, bajo las diferentes condiciones de oxígeno. Esto también pudo observarse en *A. punctatum*, sin embargo, existían casos en los cuales existía reducción del tamaño o de la cantidad de branquias externas (Harrison, 1921).

Las extirpaciones y trasplantes de branquias externas realizados en *A. punctatus* muestran la capacidad que tienen el ectodermo y mesodermo branquial de formar branquias. El ectodermo y endodermo de la periferia son capaces de actuar de la misma manera (Harrison, 1921). Nuestras observaciones de los individuos con sus branquias extraídas nos llevan a suponer que los filamentos branquiales de *H. elachyhistus* y *H. nexipus* están compuestos por las tres capas embrionarias,

principalmente por la presencia de vasos sanguíneos y circulación sanguínea en las branquias y los filamentos branquiales. Sin embargo, herramientas moleculares son importantes para determinar el origen embrionario de los filamentos branquiales de los individuos con las branquias extraídas de las dos especies de *Hyloxalus*.

En embriones de *Agalychnis callidras*, se ha observado que bajo diferentes condiciones de oxígeno, las branquias externas tienen una tasa diferente de crecimiento. En condiciones hipóxicas, las branquias tienen una tasa de crecimiento mayor, mientras en condiciones hiperoxicas, las branquias tienen una tasa de crecimiento menor (Warkentin, 2002). Razón por la que se sugiere que la regeneración embrionaria branquial es oxígeno dependiente. En ninguna de las medidas morfológicas analizadas se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de normoxia e hipoxia leve, de embriones con branquias cortadas y embriones con branquias regeneradas. Lo que lleva a suponer que las branquias externas cumplen un papel importante en el desarrollo embrionario bajo condiciones de hipoxia y que la regeneración embrionaria de las mismas permite que los embriones tengan una tasa de crecimiento estable a lo largo de su desarrollo. Sin embargo, una muestra mayor y condiciones mejor controladas de oxígeno son importantes para dilucidar la importancia de las branquias durante eventos de hipoxia.

La ausencia de diferencias significativas en el crecimiento de los diferentes embriones, bajo condiciones hipóxicas leves y normóxicas, también sugiere que las branquias no son el principal mecanismo de intercambio gaseoso. Esta característica no es nueva dentro de los ectotermos, ya que se ha observado en larvas de peces que las principales superficies de intercambio gaseoso son la piel y la cola (Mendelsohn et al., 2008). De igual forma, observaciones en otros anfibios, como *A. punctatus*, mostraron que, tras la extirpación de las branquias, algunos individuos son capaces de desarrollarse normalmente (Harrison, 1921). También en otros grupos de anuros como los desarrolladores directos, se ha observado la ausencia de branquias externas durante el desarrollo y se ha propuesto a la cola como principal estructura respiratoria debido a su morfología estructural (Goldberg y Candioti, 2015; Nokhbatolfoghahai et al., 2010). Sin embargo, no se puede determinar qué tan importantes son las branquias

en comparación con otras superficies respiratorias, ya que no se puede bloquear la captación de oxígeno en la piel o la cola exclusivamente. Esto requeriría métodos diferentes de experimentación.

## 7. CONCLUSIONES

El desarrollo directo es una estrategia que ha evolucionado independientemente en los anuros, varias veces en varios grupos, y posee una gran variación en el orden, patronamiento y presencia de varias estructuras, como fue evidenciado en relaciones comparativas de *Noblella* sp., *Noblella* aff. *heyeri* y *Osornophryne occidentalis* con otros desarrolladores directos, lo que sugiere que la variación de estas características se debe a las condiciones ambientales específicas de cada especie.

*Noblella* sp., *Noblella* aff. *heyeri* y *Osornophryne occidentalis* son las tres primeras especies de anuros de su género en las que se describe el desarrollo embrionario, sin embargo no son las primeras en ser reportadas con este método reproductivo en el país, por lo que mas estudios en otras en otras especies son importantes para comprender mejor las relaciones evolutivas de este método reproductivo.

Los embriones de *Hyloxalus nexipus* e *Hyloxalus elachyhistus* son capaces de sobrevivir y desarrollarse bajo condiciones normóxicas e hipóxicas leves aún en ausencia de branquias externas, de igual forma que los desarrolladores directos, en los cuales, las branquias están ausentes en la mayoría de las especies, con excepción de la familia Eleutherodactylidae.

Las branquias externas embrionarias son caracteres con alta plasticidad dentro de los anuros. Como se ha observado en dendrobatidae, las branquias externas pueden variar su tamaño en relación a la concentración de oxígeno en el ambiente del embrión; también, si son extraídas, son capaces de crecer de nuevo bajo condiciones levemente hipóxicas.

Durante el desarrollo directo se presume que la cola es el principal órgano respiratorio, y debido a observaciones en el desarrollo de embriones de *H. nexipus* y *H. elachyhistus* con branquias extirpadas, parece que la cola cumple la misma función respiratoria en los dendrobátidos y posiblemente en todo anura, por lo que más

estudios en el desarrollo y morfología de estructuras respiratorias embrionarias en otras especies son importantes.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AmphibiaWeb. (2018). Retrieved March 31, 2018, from <https://amphibiaweb.org/>
- Anstis, M. (2008). Direct development in the Australian myobatrachid frog *Metacrinia nicholli* from Western Australia. *Records of the Western Australian Museum*, 24, 133–150. Retrieved from [papers2://publication/uuid/A235A50A-9D13-4DF1-8CF8-CCE15DA30AFC](https://papers2://publication/uuid/A235A50A-9D13-4DF1-8CF8-CCE15DA30AFC).
- Bahir, M., Meegaskumbura, M., Manamendra-Arachchi, K., Schneider, J., Pethiyagoda, R. (2005). Reproduction and Terrestrial Direct Development in Sri Lankan Shrub Frogs ( Ranidae : Rhacophorinae : Philautus ). *The Raffles Bulletin of Zoology, Supplement*(12), 339–350.
- Bickler, P., Buck, L. (2007). Hypoxia Tolerance in Reptiles, Amphibians, and Fishes: Life with Variable Oxygen Availability. *Annual Review of Physiology*, 69(1), 145–170. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.162529>.
- Catenazzi, A., Uscapi, V., Von May, R. (2015). A new species of noblella (Amphibia, Anura, Craugastoridae) from the humid Montane forests of Cusco, Peru. *ZooKeys*, 2015(516), 71–84. <https://doi.org/10.3897/zookeys.516.9776>.
- Coloma, L. (1995). Ecuadorian frogs of the genus *Colostethus* (Anura: Dendrobatidae). *Miscellaneous Publications of the Natural History Museum, Univ. of Kansas*, 87(87), 1–72. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.16171>.
- Contreras, J. (2015). *Descripción morfológica de los embriones de Hyloxalus nexipus (Anura: Dendrobatidae) desde el clivaje hasta la eclosión del renacuajo*. Universidad Católica del Ecuador.
- de Lima, A., Reis, A., Amado, G., Cassiano-Lima, D., Borges-Nojosa, D., Oriá, R., Abreu, J. (2016). Developmental aspects of the direct-developing frog *Adelophryne maranguapensis*. *Genesis*, 54(5), 257–271. <https://doi.org/10.1002/dvg.22935>.

- Del Pino, E., Ávila, M., Pérez, O., Benítez, M., Alarcón, I., Noboa, V., Moya, I. (2004). Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *International Journal of Developmental Biology*, 48(7), 663–670. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041861ed>.
- Downie, J. R., Nokhbatolfoghahai, M., Bruce, D., Smith, J. M., Orthmann-Brask, N., MacDonald-Allan, I. (2013). Nest structure, incubation and hatching in the Trinidadian leaf-frog *Phyllomedusa trinitatis* (Anura: Hylidae). *Phyllomedusa*, 12(1), 13–32.
- Duellman, W. E. (1992). Reproductive Strategies of Frogs. *SCIENTIFIC AMERICAN*, 267(1), 80–87.
- Duellman, W. E. (2004). Frogs of the genus *Colostethus* (Anura; Dendrobatidae) in the Andes of northern Peru. *Natural History Museum - The University of Kansas*, 35(35), 1–49. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.8467>.
- Elinson, R. P., del Pino, E. M. (2012). Developmental diversity of amphibians. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(3), 345–369. <https://doi.org/10.1002/wdev.23>.
- Goldberg, J., Candiotti, F. V. (2015). A Tale of a Tail: Variation during the Early Ontogeny of *Haddadus binotatus* (Brachycephaloidea: Craugastoridae) as Compared with Other Direct Developers. *Journal of Herpetology*, 49(3), 479–484. <https://doi.org/10.1670/14-072>.
- Goldberg, J., Candiotti, F. V., Akmentins, M. S. (2012). Direct-developing frogs: Ontogeny of *Oreobates barituensis* (Anura: Terrarana) and the development of a novel trait. *Amphibia Reptilia*, 33(2), 239–250. <https://doi.org/10.1163/156853812X638527>.
- Gomez-Mestre, I., Pyron, R. A., Wiens, J. J. (2012). Phylogenetic analyses reveal unexpected patterns in the evolution of reproductive modes in frogs. *Evolution*, 66(12), 3687–3700. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01715.x>.
- Gosner, K. L. (1960). A Simplified Table for Staging Anuran Embryos Larvae with Notes

- on Identification. *Herpetologists' League*, 16(3), 183–190.  
<https://doi.org/10.2307/3890061>.
- Gosner, K. L., Rossman, D. A. (1960). Eggs and larval development of the treefrogs *Hyla crucifer* and *Hyla ocularis*. *Herpetologica*, 16(4), 225–232.
- Gururaja, K. V., Ramachandra, T. V. (2006). Developmental mode in white-nosed shrub frog *Philautus cf. leucorhinus*. *Current Science*, 90(3), 450–454.
- Haddad, C. F. B., Prado, C. P. (2005). Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience*, 55(3), 207–217.  
[https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0207:RMIFAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0207:RMIFAT]2.0.CO;2).
- Harrison, G. R. (1921). Experiments on the Development of the Gills in the Amphibian Embryo. *Biological Bulletin*, Vol. 41, No. 3 (Sep., 1921), pp. 156-168+170. The University of Chicago Press in association with the Marine Biological Laboratory.  
<https://www.jstor.org/stable/1536747>.
- Hervas, F., Torres, K. P., Montenegro-Larrea, P., Del Pino, E. M. (2015). Development and gastrulation in *Hyloxalus vertebralis* and *Dendrobates auratus* (Anura: Dendrobatidae) Official journal website: amphibian-reptile-conservation.org. *Amphibian & Reptile Conservation*, 8(2), 121–135. Retrieved from [http://www.amphibian-reptile-conservation.org/pdfs/Volume/Vol\\_8\\_no\\_1/ARC\\_8\\_1\\_\[Special\\_Section\]\\_121-135\\_e90\\_low\\_res.pdf](http://www.amphibian-reptile-conservation.org/pdfs/Volume/Vol_8_no_1/ARC_8_1_[Special_Section]_121-135_e90_low_res.pdf).
- Hurme, K., Gonzalez, K., Halvorsen, M., Foster, B., Moore, D., Chepko-Sade, B. D. (2003). Environmental Enrichment for Dendrobatid Frogs. *APPLIED ANIMAL WELFARE SCIENCE*, 6(4), 285–299.
- IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Jennings, D. H., & Hanken, J. (1998). Mechanistic basis of life history evolution in anuran amphibians: Thyroid gland development in the direct-developing frog,

- Eleutherodactylus coqui. *General and Comparative Endocrinology*, 111(2), 225–232. <https://doi.org/10.1006/gcen.1998.7111>.
- Liedtke, H. C., Müller, H., Hafner, J., Penner, J., Gower, D. J., Mazuch, T., Loader, S. P. (2017). Terrestrial reproduction as an adaptation to steep terrain in African toads. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1851), 20162598. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2598>.
- Maina, J. N. (2002). Structure, function and evolution of the gas exchangers: Comparative perspectives. *Journal of Anatomy*. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00099.x>.
- Mendelsohn, B. A., Kassebaum, B. L., Gitlin, J. D. (2008). The zebrafish embryo as a dynamic model of anoxia tolerance. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 237(7), 1780–1788. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21581>.
- Narayan, E. J., Hero, J. M., Christi, K. S., Morley, C. G. (2011). Early developmental biology of *Platymantis vitiana* including supportive evidence of structural specialization unique to the ceratobatrachidae. *Journal of Zoology*, 284(1), 68–75. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2010.00782.x>.
- Nokhbatolfoghahai, M., Downie, J. R. (2008). The external gills of anuran amphibians: Comparative morphology and ultrastructure. *Journal of Morphology*, 269(10), 1197–1213. <https://doi.org/10.1002/jmor.10655>.
- Nokhbatolfoghahai, M., Downie, J. R., Atherton, L. (2013). External gill motility and striated muscle presence in the embryos of anuran amphibians. *Tissue and Cell*, 45(1), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2012.09.007>.
- Nokhbatolfoghahai, M., Mitchel, N. J., Downie, J. R. (2010). Surface ciliation and tail structure in direct-developing frog embryos: A comparison between *Myobatrachus gouldii* and *Pristimantis* (= *Eleutherodactylus*) *urichi*. *Herpetological Journal*, 20(2), 59–68. Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/contentone/bhs/thj/2010/00000020/00000002/art>

00001.

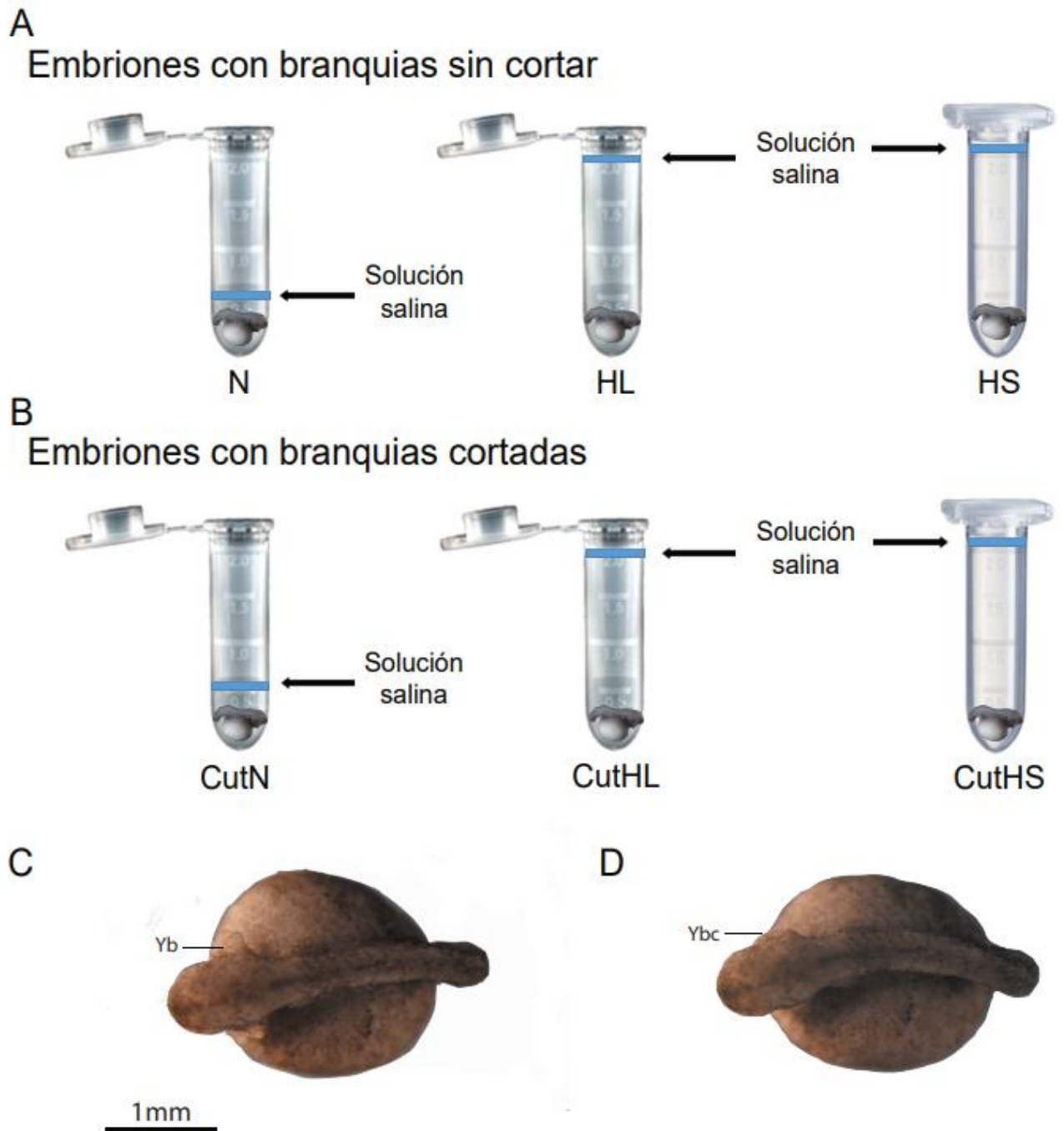
- Páez-Moscoso, D. J., Guayasamin, J. M., y Yáñez-Muñoz, M. (2011). A new species of Andean toad (Bufonidae, Osornophryne) discovered using molecular and morphological data, with a taxonomic key for the genus. <https://doi.org/10.3897/zookeys.108.1129>.
- Reizis, A., Hammel, I., Ar, A. (2005). Regional and developmental variations of blood vessel morphometry in the chick embryo chorioallantoic membrane, 2483–2488. <https://doi.org/10.1242/jeb.01662>.
- Rogge, J. R., Warkentin, K. M. (2008). External gills and adaptive embryo behavior facilitate synchronous development and hatching plasticity under respiratory constraint. *The Journal of Experimental Biology*, 211(Pt 22), 3627–3635. <https://doi.org/10.1242/jeb.020958>.
- Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (2018). Anfibios del Ecuador. Version 2018.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Osornophryne%20occidentalis>, acceso sábado, 20 de Octubre de 2018.
- Schweiger, S., Naumann, B., Larson, J. G., Möckel, L., Müller, H. (2017). Direct development in African squeaker frogs (Anura: Arthroleptidae: Arthroleptis) reveals a mosaic of derived and plesiomorphic characters. *Organisms Diversity and Evolution*, 17(3), 693–707. <https://doi.org/10.1007/s13127-017-0335-5>.
- Seymour, R. S., Roberts, J. D., Mitchell, N. J., Blaylock, A. J. (2000). Influence of environmental oxygen on development and hatching of aquatic eggs of the Australian frog, *Crinia georgiana*. *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ*, 73(4), 501–507. <https://doi.org/10.1086/317739>.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012), "[NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis](#)", *Nature methods* **9(7)**: 671-675, [PMID 22930834](#) ([on Google Scholar](#)).

- Shield, J. W., Bentley, P. J. (1973). Respiration of some urodele and anuran amphibia. I. In water, role of the skin and gills. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology*, 46(1), 17–28.
- Touchon, J. C., Warkentin, K. M. (2008). Reproductive mode plasticity: aquatic and terrestrial oviposition in a treefrog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(21), 7495–7499. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711579105>.
- Townsend, D. S., Stewart, M. M. (1985). Direct Development in *Eleutherodactylus coqui* (Anura : Leptodactylidae): A Staging Table. *Copeia*, 1985(2), 423–436.
- Wake, M. H. (1980). The Reproductive Biology of *Nectophrynoides malcolmi* (Amphibia: Bufonidae), with Comments on the Evolution of Reproductive Modes in the Genus *Nectophrynoides*. *Copeia*, 1980(2), 193–209. <https://doi.org/10.2307/1443998>.
- Warkentin, K. M. (1999). Effects of hatching age on development and hatchling morphology in the red-eyed tree frog, *Agalychnis callidryas*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68(3), 443–470. <https://doi.org/10.1006/bijl.1999.0325>.
- Warkentin, K. M. (2000). Environmental and developmental effects on external gill loss in the red-eyed tree frog, *Agalychnis callidryas*. *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ*, 73(5), 557–565. <https://doi.org/10.1086/317751>.
- Warkentin, K. M. (2002). Hatching timing, oxygen availability, and external gill regression in the tree frog, *Agalychnis callidryas*. *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ*, 75(2), 155–164. <https://doi.org/10.1086/339214>.
- Warkentin, K. M. (2007). Oxygen, gills, and embryo behavior: mechanisms of adaptive plasticity in hatching. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 148(4), 720–731. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.02.009>.
- Warkentin, K. M., y Wassersug, R. J. (2001). Do prostaglandins regulate external gill

regression in anurans? *Journal of Experimental Zoology*, 289(6), 366–373.  
<https://doi.org/10.1002/jez.1018>.

Yáñez-Muñoz, M. H., Altamirano-Benavides, M., Cisneros-Heredia, D. F., Gleusenkamp, A. G. (2010). Nueva especie de Sapo Andino del género *Osornophryne* (Amphibia: Bufonidae) del norte de Ecuador, con notas sobre la diversidad del género en Colombia. Retrieved from [http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/avances/archivo\\_de\\_contenidos/Documents/volumen\\_2\\_numero\\_3/Avances\\_2010\\_vol2\\_B46-B53.pdf](http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/avances/archivo_de_contenidos/Documents/volumen_2_numero_3/Avances_2010_vol2_B46-B53.pdf).

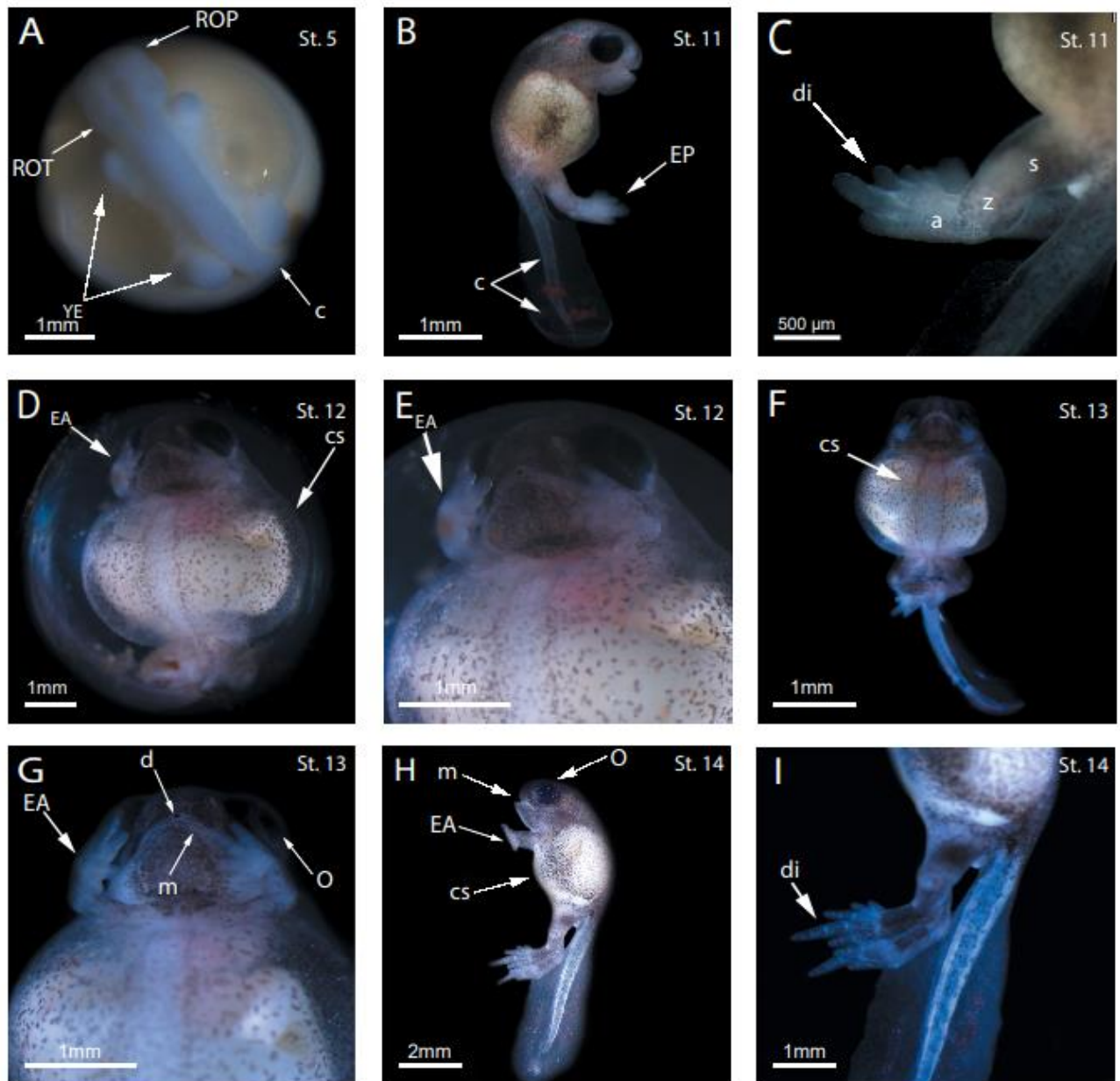
## 9. FIGURAS



E



**Figura 1. Esquema del montaje de camaras experimentales.** (A) Esquema de la vista lateral de las camaras con diferente concentración de oxígeno para embriones con branquias sin cortar. Todos los tubos contenian solucion salina Steinberg 1X N (Tratamiento normoxia), HL (Tratamiento hipóxía leve), HS (Tratamiento hipóxía severa). (B) Esquema de la vista lateral de las camaras hipóxicas para embriones con branquias cortadas. Todos los tubos contenian solucion salina Steinberg 1X. CutN (Tratamiento normoxia), cutHL (Tratamiento hipóxía leve), cutHS (Tratamiento hipóxía severa). (C) Vista dorsal de embrión de *Hyloxalus nexipus*, estadio 19, con las yemas de las branquias (YB). (D) Vista dorsal del mismo embrión sin yemas de las branquias, extraidas mecánicamente. Ybc (Yemas de las branquias cortadas). (E) Se observan las medidas morfologícas analizadas: ancho de la cabeza (AC), ancho de la yema (AY), longitud cuerpo-cola (LCP), longitud branquia derecha (LBD), longitud branquia izquierda (LBI), longitud total (LT) y ancho de la cola (ACo).



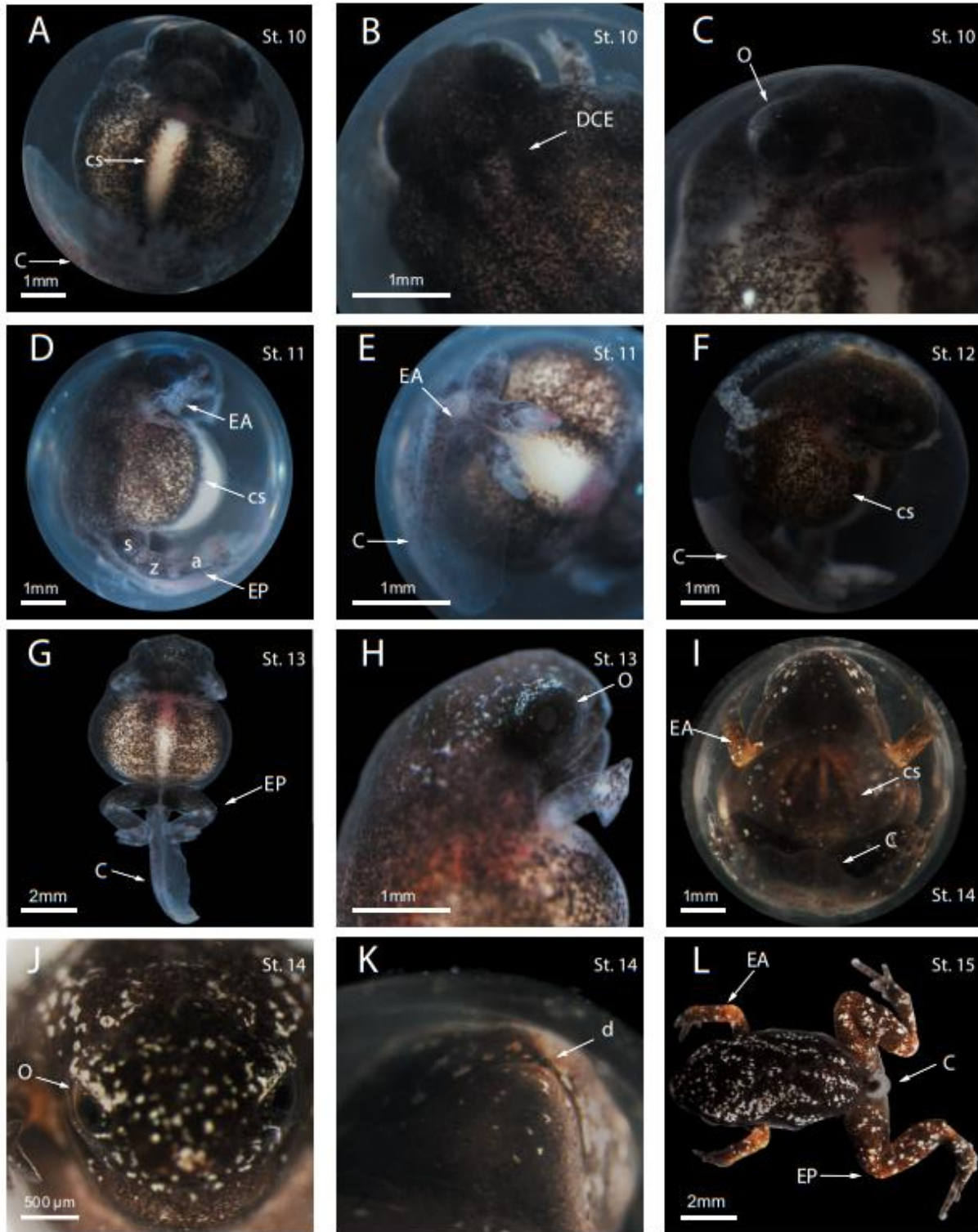
**Figura 2. Series del desarrollo embrionario de *Noblella aff. heyeri*. Estadios 5-14.**

(A) Estadio 5. Las flechas indican las yemas de las extremidades y la cabeza. La cabeza se divide en región óptica y región ótica. (B-C) Estadio 11. Se muestra el desarrollo de dígitos y cola con aleta. (B) Se observa la extensión máxima de la cola y vascularización. (D) y (E) muestran el estadio 12. La cobertura secundaria se expande y las extremidades se elongan. (F) Se observa el cierre de la pared del cuerpo en el

estadio 13. (G) Se observan las maxilas, el diente embrionario, la elongación de los dígitos y la pigmentación de la pupila. (H-I) Estadio 14, las extremidades están desarrolladas en su totalidad, al igual que los ojos y las maxilas. (I) Se observan los dígitos desarrollados completamente. ROP (región óptica), ROT (región ótica), YE (yemas de las extremidades), c (cola), EA (extremidades anteriores), EP (extemidades posteriores), z (zeugopodio), s (estilopodio), a (autopodio), di (dígitos), CS (cobertura secundaria), m (maxilas), d (diente embrionario), o (ojo).

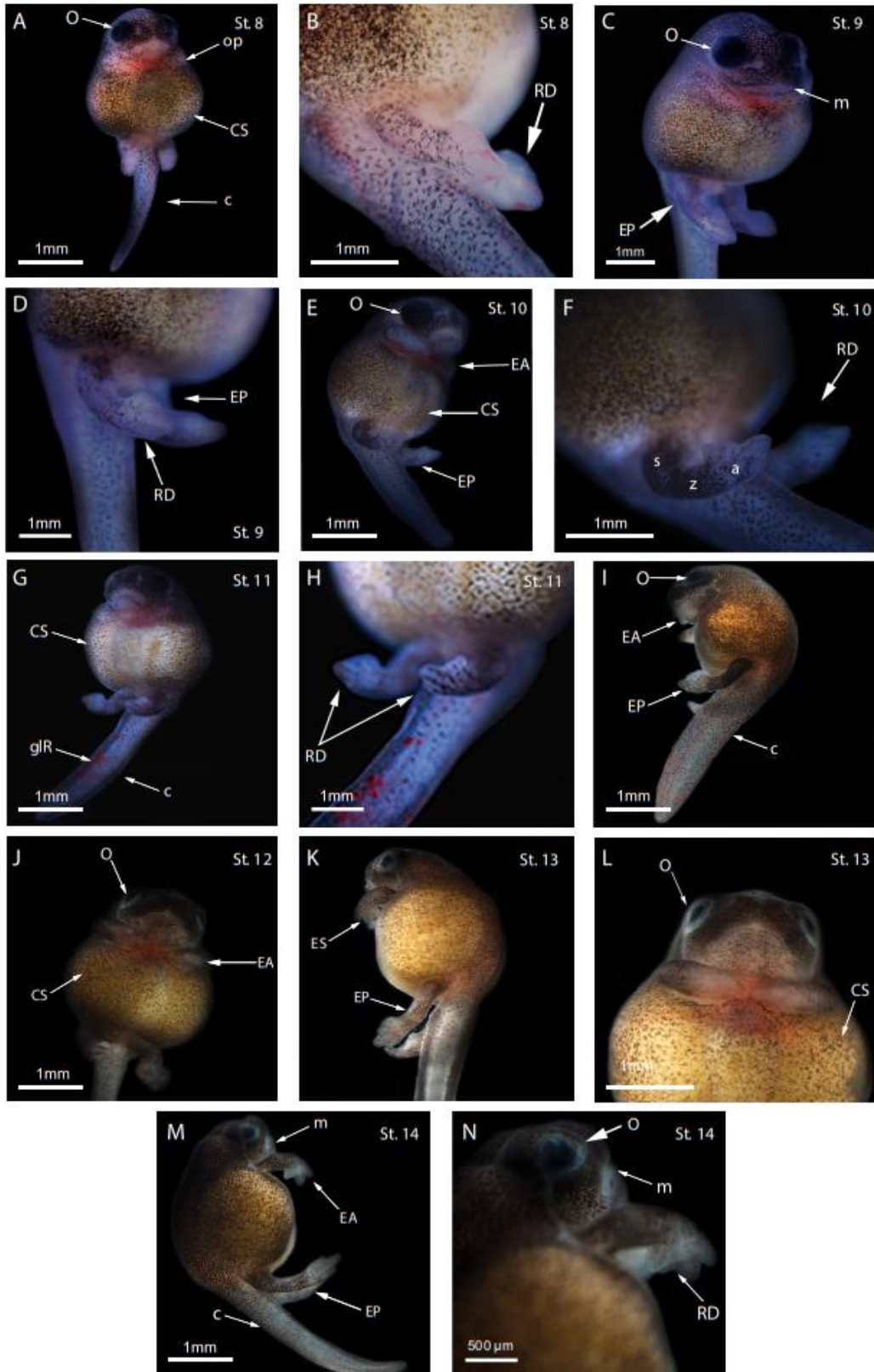


extremidades, la cola y la cabeza. En (C) se observan los depósitos de calcio endolinfáticos y la pigmentación en la cabeza. (D) muestra una vista lateral del embrión. (E) Estadio 6. Se observa el disco de pigmento en el centro del embrión, la elongación de las yemas de las extremidades y los DCE. (F) Muestra al embrión en vista lateral durante el estadio 7; se observa la cobertura secundaria. (G) Se observan las constricciones en las extremidades que darán origen al estilopodio y zeugopodio. Las vesículas ópticas son visibles y se observa también la expansión del disco de pigmento y la pared del cuerpo. En (H-I) se indica la expansión de los DCE, también el crecimiento de la cola y la pared del cuerpo, en estadio 8. (J-L) muestran el estadio 9. En (J) se observa el crecimiento de la pared del cuerpo y la elongación de las extremidades. (K) Muestra el crecimiento de las vesículas ópticas y a los DCE cubiertos por pigmento. En (l) se puede observar al autopodio y la presencia de rudimentos digitales. YEP (yemas de las extremidades posteriores), YEA (yemas de las extremidades anteriores), ROP (región óptica), ROT (región óptica), DCE (depósitos de calcio endolinfático), c (cola), CS (cobertura secundaria), VO (vesículas ópticas), cn (constricción), RD (rudimentos digitales), s (estilopodio), z (zeugopodio), a (autopodio).

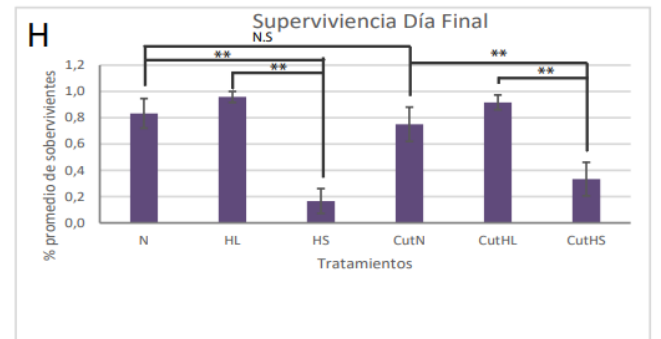
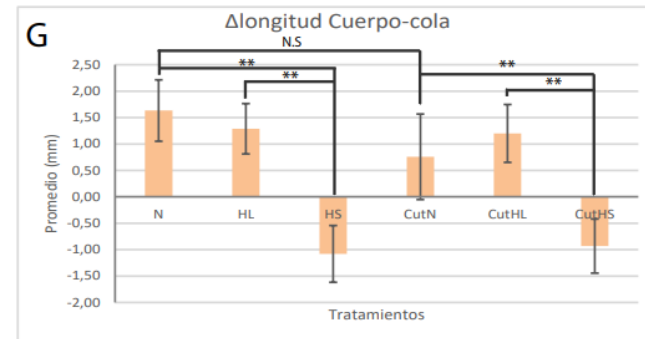
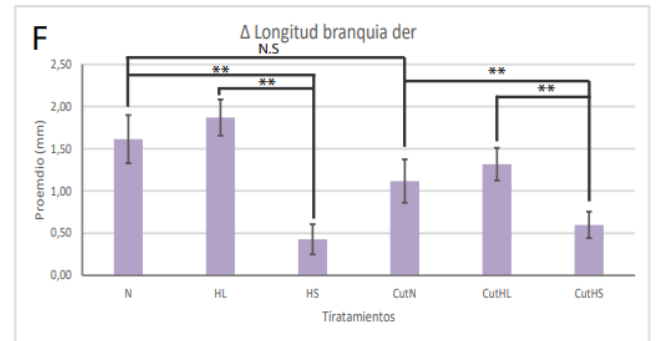
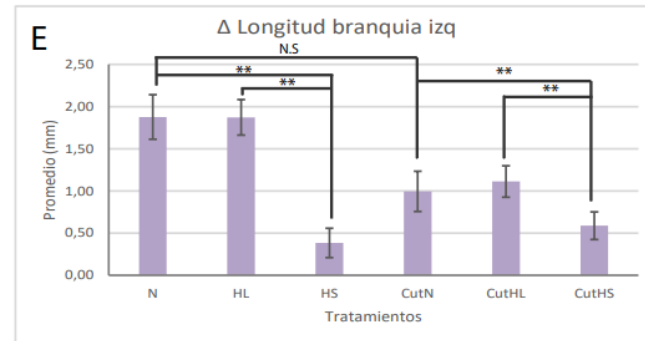
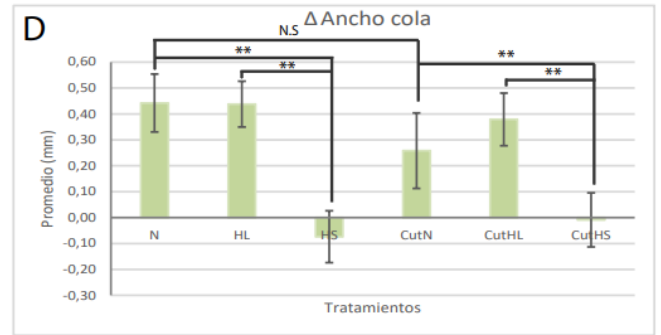
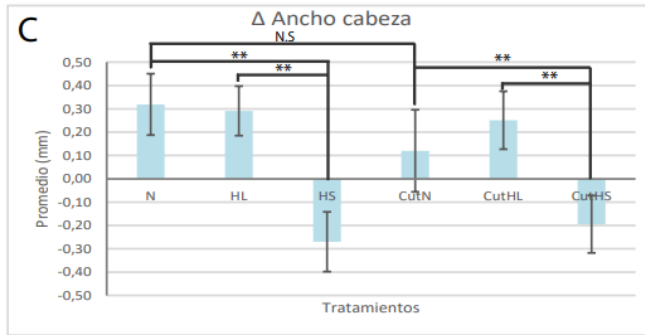
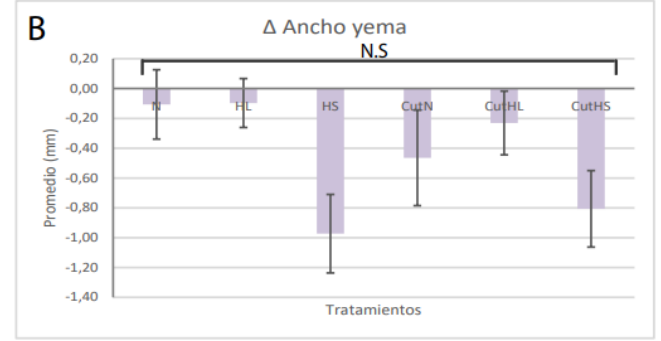
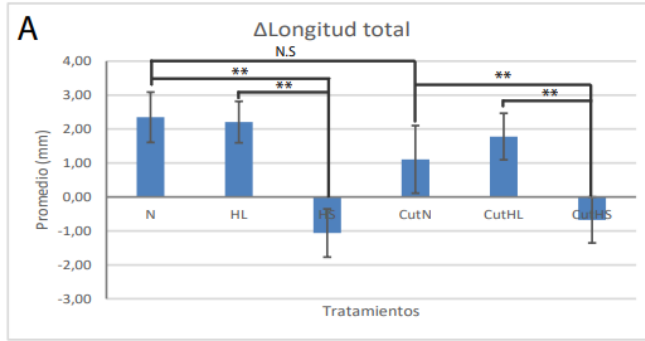


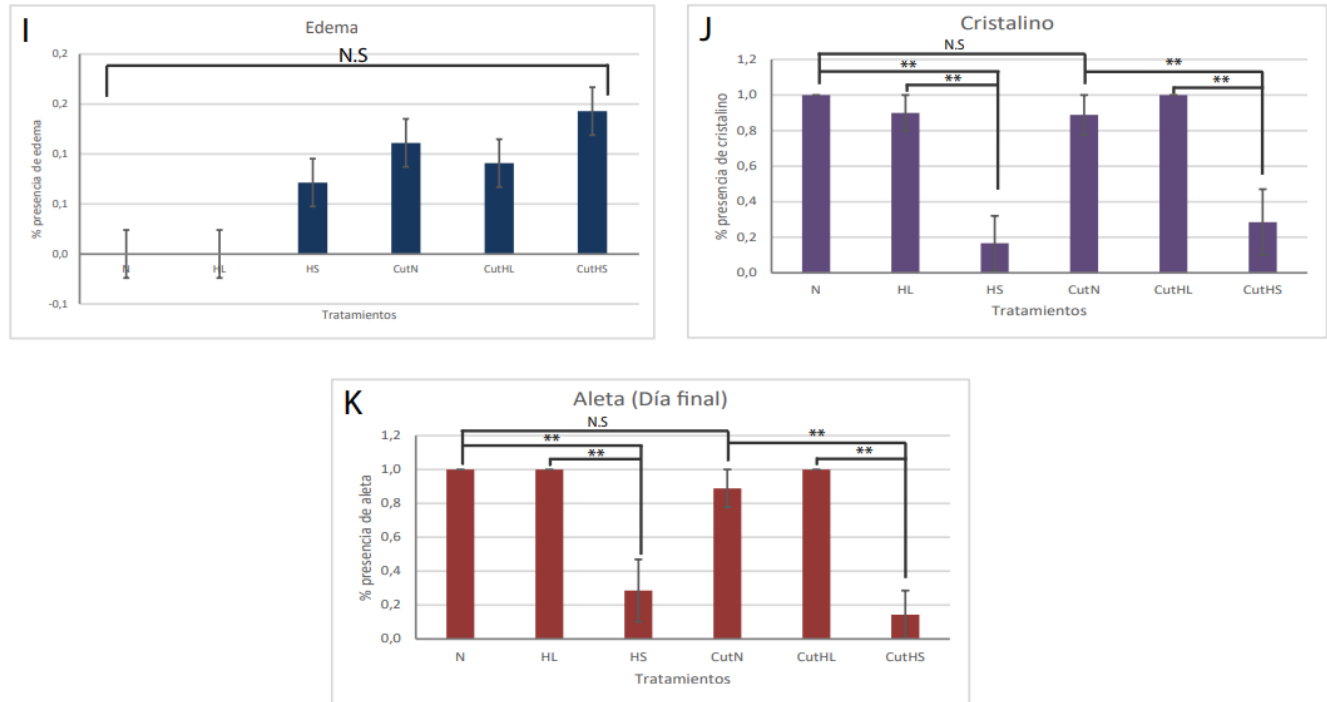
**Figura 4.** Series del desarrollo embrionario de *Noblella* sp. estadios 10 hasta eclosión. (A-C) Estadio 10. En (A) se muestra el crecimiento de la cola, también se

observa la cobertura secundaria (pared del cuerpo) sin cerrarse en la línea media. En (B) se observa la presencia de los DCE. En (C) se muestra la extensión de las maxilas y la pigmentación en los ojos. (D-E) indican el estadio 12. (D) Vista lateral, se observa la cobertura secundaria y las e. anteriores. (E) Muestra el desarrollo de las e. posteriores con los quiridios bien definidos, también se observa la cola y aleta caudal vascularizadas. En (F) se observa el estadio 12. En (G-H) se puede observar la elongación de las extremidades, la expansión de la pared del cuerpo, la regresión de la cola, el desarrollo del ojo y las maxilas, en estadio 13. (I-K) Estadio 14. En (I) se observa el cierre total de la pared del cuerpo, (J) muestra el desarrollo final de los ojos y la pigmentación de la cabeza. En (K) se observan las maxilas y el diente de huevo. En (L) se observa un individuo recién eclosionado en estadio 15, se observa la pigmentación final del embrión y la regresión total de la cola. DCE (depósitos de calcio endolinfático), c (cola), CS (cobertura secundaria), o (ojo), EP (extremidades posteriores), EA (extremidades anteriores), s (estilopodio), z (zeugopodio), a (autopodio), d (diente embrionario).

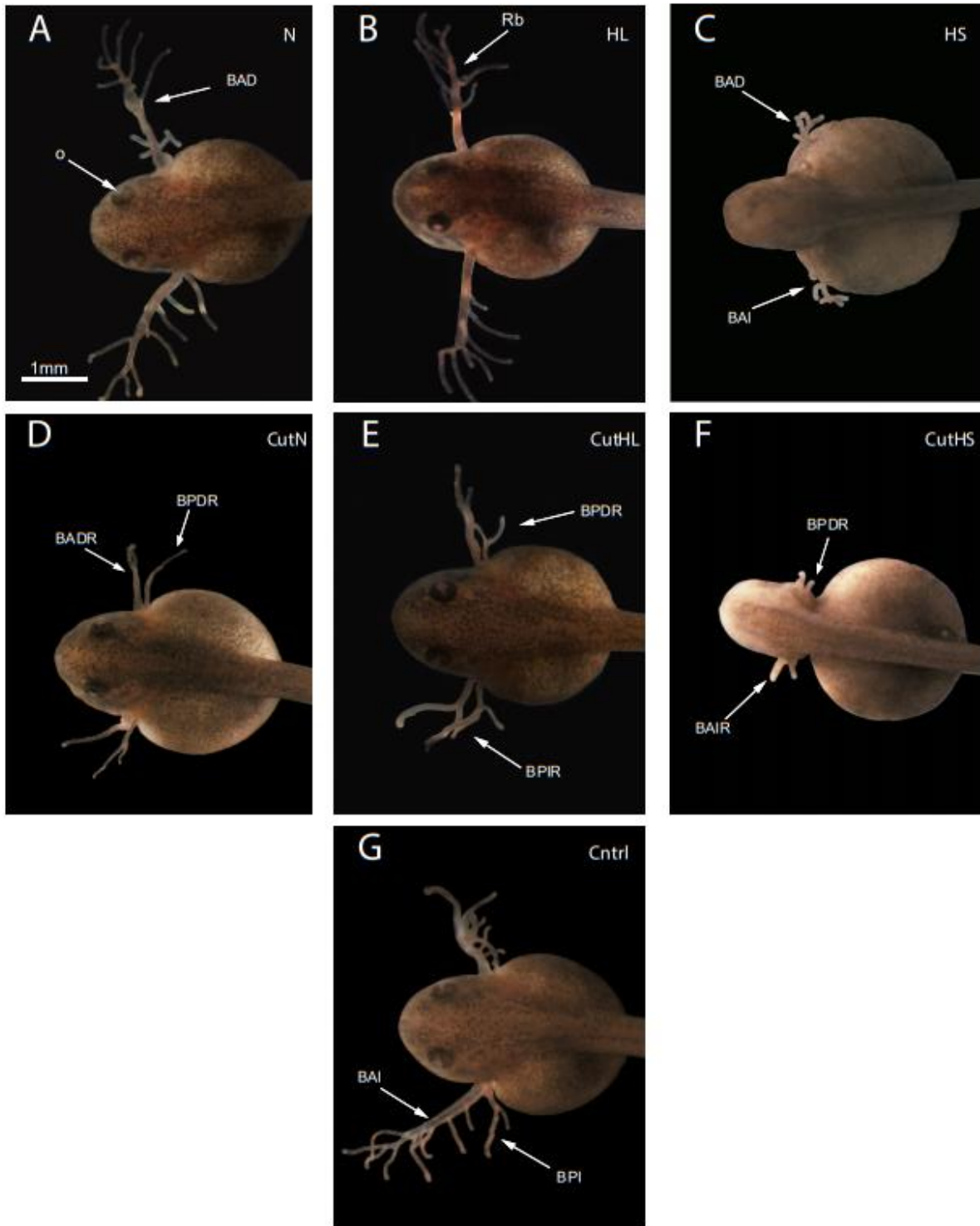


**Figura 5. Series del desarrollo embrionario de *Osornophryne occidentalis*.** (A-B) representan el estadio 8. En (A) se observa el crecimiento de la cola y a las e. anteriores dentro del pliegue opercular. En (B) se observa la aparición del autopodio. (C-D) indican el estadio 9. En (E) y (F) se observa el estadio 10, en (E) se evidencia que las e. superiores han salido del pliegue opercular. (G-H) muestran el estadio 11, (G) indica la extensión máxima de la cola y vascularización (se observa agrupaciones de glóbulos rojos en la cola), (H) Muestra los rudimentos digitales. (I-J) Se observa el estadio 12, (J) Muestra la elongación de las e. anteriores y el cierre de la pared del cuerpo. (K-L) muestran el estadio 13, los ojos están desarrollados y los DCE ya no son visibles. (M-N): indican el estadio 14, las extremidades están desarrolladas en su totalidad, al igual que los ojos. OP (opérculo), c (cola), m (maxilas), CS (cobertura secundaria), o (ojo), EP (extremidades posteriores), EA (extremidades anteriores), s (estilopodio), z (zeugopodio), a (autopodio), glR (glóbulos rojos).



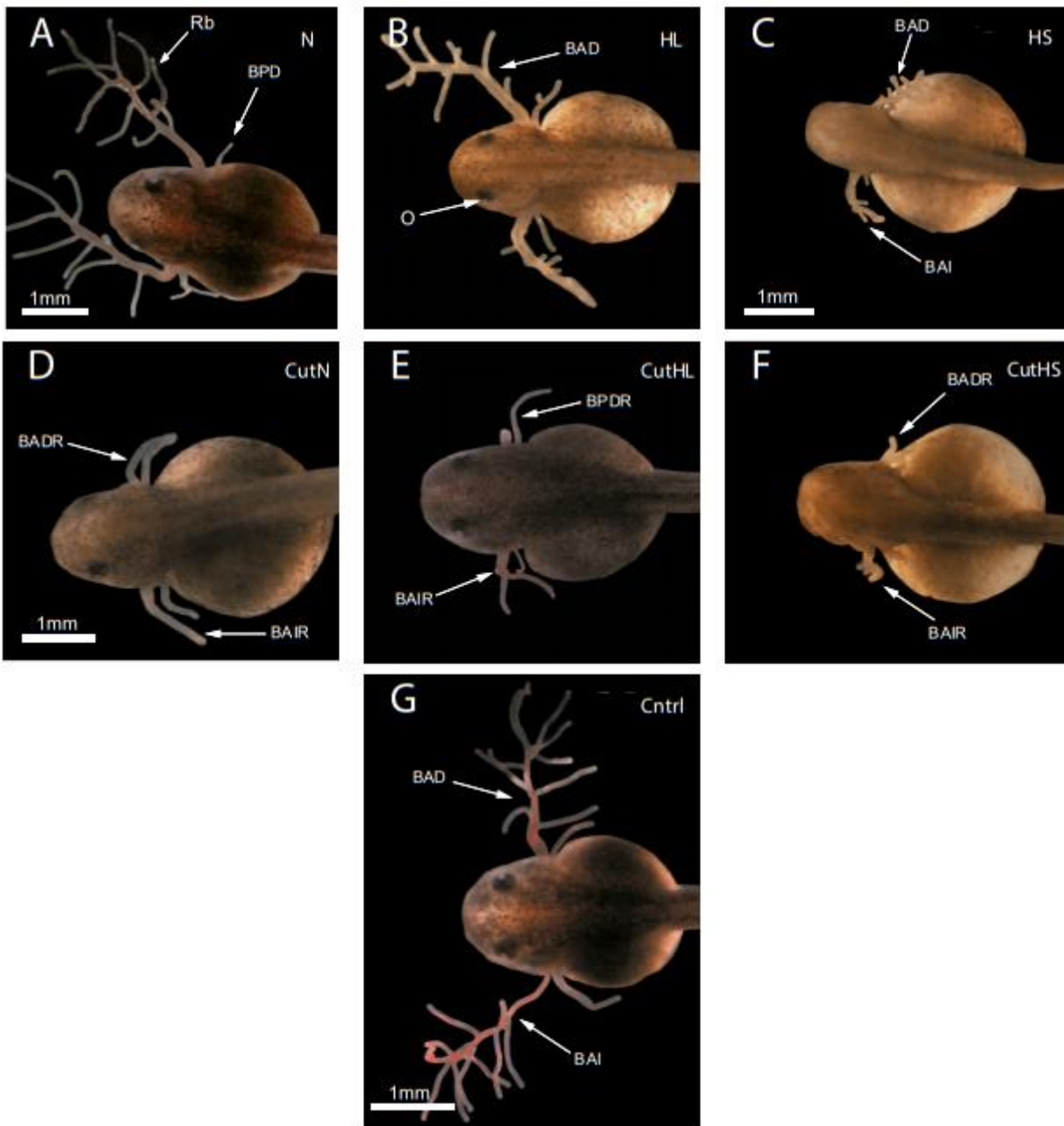


**Figura 6. Diferencias de las características morfológicas, supervivencia y formación de estructuras en embriones de *Hyloxalus nexipus* bajo diferentes condiciones de oxígeno.** (A-G) Muestra los promedios de la variación delta entre las medidas morfométricas en el tiempo experimental. (A) La hipoxia severa (HS y CutHS) afecta el crecimiento de los embriones en el tiempo. (B) No existen diferencias significativas en el promedio de variación del ancho de la yema, entre tratamientos. (C) La hipoxia severa afecta la expansión del ancho de la cabeza de los embriones en el tiempo. (D) El ancho de la cola es similar en condiciones de normoxia (N y cutN) e hipoxia leve (HL y cutHL). (E-F) El crecimiento de las branquias externas es menor en embriones sometidos a hipoxia severa. (G) La longitud del cuerpo y la cola, durante el desarrollo, se ven afectados por la hipoxia severa. (H) La hipoxia severa (HS y CutHS) afecta la supervivencia de los embriones. (I) No existen diferencias significativas del promedio de presencia de edemas entre tratamientos. (J) La presencia de cristalino es similar en condiciones normoxicas (N y CutN) y de hipoxia leve (HL y Cut HL). (K) La presencia de aleta se vio afectada por las condiciones de hipoxia severa (HS y CutHS). Las barras de error se obtuvieron a partir del error estándar, el cual se calculó dividiendo la desviación estándar para la raíz del tamaño de muestra por tratamiento.



**Figura 7. Embriones de *Hyloxalus nexipus* en estadio 23, sometidos a diferentes condiciones de oxígeno. Día final de experimentación. (A), (B) y (C) muestran embriones con sus branquias externas embrionarias. (D), (E) y (F) representan a**

embriones cuyas branquias fueron removidas mecánicamente. (G) muestra la morfología de los embriones control. (A) y (G) muestran la extensión máxima branquial que debería observarse a finales del estadio 23, se observa las branquias anteriores (BA) y posteriores (BP), también se puede evidenciar las ramificaciones branquiales (Rb), y se observa los ojos con pupila y cristalino (O). (B) indica la morfología de embriones que han sido sometidos a hipóxia leve. (C) muestra la influencia que la hipóxia severa ha tenido sobre los embriones con branquias. (D-F) muestra la influencia que los diferentes tratamientos han tenido sobre los embriones sin branquias. En (D-F) se puede observar una regeneración parcial de las branquias externas. Normoxia (Trt N), hipóxia leve (Trt HL), hipóxia severa (Trt HS) y control (Cntrl), BAI (branquia anterior izquierda), BAD (branquia anterior derecha), BAIR (branquia anterior izquierda regenerada), BADR (branquia anterior derecha regenerada), BPI (branquia posterior izquierda), BPD (branquia posterior derecha), BPDR (branquia posterior derecha regenerada), BPIR (branquia posterior izquierda regenerada).



**Figura 8.** Embriones de *Hyloxalus helachyhistus* en estadio 23, sometidos a diferentes condiciones de oxígeno. Día final de experimentación. (A), (B) y (C) muestran embriones con sus branquias externas embrionarias. (D), (E) y (F) representan a embriones cuyas branquias fueron removidas mecánicamente. (G) muestra la morfología de los embriones control. (A) y (G) muestran la extensión máxima branquial que debería observarse a finales del estadio 23, se observa las branquias anteriores (BA)

y posteriores (BP), también se puede evidenciar las ramificaciones branquiales (Rb), y se observa los ojos con pupila y cristalino (O). (B) indica la morfología de embriones que han sido sometidos a hipóxia leve. (C) muestra la influencia que la hipóxia severa ha tenido sobre los embriones con branquias. (D-F) muestra la influencia que los diferentes tratamientos han tenido sobre los embriones sin branquias. En (D-F) se puede observar una regeneración parcial de las branquias externas. Normoxia (Trt N), hipóxia leve (Trt HL), hipóxia severa (Trt HS) y control (Cntrl), BAI (branquia anterior izquierda), BAD (branquia anterior derecha), BAIR (branquia anterior izquierda regenerada), BADR (branquia anterior derecha regenerada), BPI (branquia posterior izquierda), BPD (branquia posterior derecha), BPDR (branquia posterior derecha regenerada), BPIR (branquia posterior izquierda regenerada).

## 10. TABLAS

**Tabla 1. Características morfológicas presentes durante el desarrollo de *Noblella aff. heyeri*, *Noblella sp.*, y *Osornophryne occidentalis*.**

<b>Estadios</b>	<b><i>Noblella aff. heyeri</i></b>	<b><i>Noblella sp.</i></b>	<b><i>Osornophryne occidentalis</i></b>
5	Yemas de las extremidades unidas al tronco (Figura 2 A).	Yemas de las extremidades unidas al tronco (Figura 3 B).	No disponible.
6	No disponible.	Los DCE son visibles, células de pigmento empiezan a rodear al embrión (Figura 3 E).	No disponible.
7	No disponible.	Las vesículas ópticas están pigmentadas, se forman constricciones en las yemas de las extremidades (Figura 3 G)	No disponible.
8	No disponible.	Se forma los ojos, las maxilas se observan por primera vez (Figura.2 I)	Las extremidades anteriores están dentro del opérculo (Figura 5 A)
9	No disponible.	Los ojos están pigmentados de negro, en las extremidades se forma el autopodio (Figura 3 K, L)	Se abren las maxilas y se forma el autopodio (Figura 5 C, D)
10	No disponible.	Pigmento cubre los DCE casi en su totalidad, la cola se está expandiendo (Figura 4 A, B).	Las extremidades anteriores salen del opérculo (Figura 5 E).

11	Máxima elongación de la cola, los dígitos están formados (Figura 2 B, C).	Las extremidades se diferencian en autopodio, estilopodio y zeugopodio (Figura 4 D)	La cola alcanza su máxima extensión, los rudimentos digitales se elongan (Figura 5. G, H)
12	La cobertura secundaria se expande y las extremidades se elongan (Figura 2 E).	La cobertura secundaria está cerca de cerrarse, la cola tiene su longitud máxima (Figura 4 F).	La pigmentación del iris disminuye y la cobertura secundaria se cierra (Figura 5 J).
13	Formación del diente embrionario y pigmentación de la pupila (Figura 2 G)	La cola comienza su regresión, y la pupila esta pigmentada (Figura 4 G, H)	Las extremidades se elongan (Figura 5 K).
14	Ojos desarrollados por completo, máxima elongación de los dígitos (Figura.1 H, I)	Los ojos están desarrollados por completo, la cobertura secundaria se ha cerrado (Figura 4 I, J).	Los ojos se han desarrollado por completo, los rudimentos digitales siguen sin diferenciarse (Figura 5 N).
15	No disponible.	La cola se ha regresado por completo, la coloración es semejante a la de los adultos (Figura 4 K).	No disponible.

---

## 11. ANEXOS

**Anexo 1. Mediciones morfológicas de individuos de *Hyloxalus nexipus* por experimento en el día inicial y el día final. Experimento (Exp), embriones (emb).**

Exp	Tratamiento	Emb	Día inicial							Día final							
			L. total	A. yema	A. cabeza	A. cola	Branq. izq	Branq. der	L. Cuerpo cola	L. total	A. yema	A. cabeza	A. cola	Branq. izq	Branq. der	L. cuerpo cola	
1	HS	B1	3,98	2,14	0,84	0,52	0,23	0,22	3,39	B1	6,80	2,89	1,17	0,99	1,07	1,06	5,05
1	HL	B2	4,34	2,06	0,85	0,52	0,25	0,26	3,63	B2	7,16	2,17	1,27	1,06	2,81	2,71	5,34
1	HS	B3	4,31	2,08	0,84	0,54	0,23	0,23	3,61	B3	6,08	2,48	1,20	0,85	1,22	1,64	4,91
1	N	B4	4,35	2,04	0,84	0,54	0,31	0,30	3,59	B4	7,27	2,13	1,28	1,13	2,84	2,73	5,62
1	CutHS	C1	4,39	1,99	0,83	0,59	0,05	0,02	3,62	C1	5,73	2,45	1,18	0,79	0,11	0,11	4,11
1	CutHL	C2	4,31	2,07	0,82	0,52	0,05	0,01	3,63	C2	6,73	2,41	1,21	0,94	0,15	0,14	5,16
1	CutHS	C3	4,41	2,06	0,83	0,54	0,02	0,00	3,57	C3	6,09	2,50	1,08	0,87	0,16	0,14	4,43
1	CutN	C4	4,33	2,00	0,82	0,53	0,01	0,01	3,67	C4	7,24	2,20	1,25	1,18	1,02	1,41	5,58
2	HS	B1	3,79	2,15	0,82	0,55	0,29	0,26	3,22	B1							
2	HL	B2	4,01	2,11	0,82	0,50	0,28	0,28	3,34	B2	7,06	2,17	1,29	1,15	2,69	2,80	5,33
2	N	B3	4,08	2,14	0,84	0,52	0,29	0,30	3,39	B3							
2	CutHS	C1	3,87	2,19	0,84	0,56	0,01	0,02	3,26	C1							
2	CutHL	C2	3,94	2,16	0,83	0,54	0,02	0,01	3,28	C2	6,75	2,24	1,29	1,10	2,10	0,98	5,05
2	CutN	C3	3,96	2,15	0,82	0,51	0,03	0,03	3,31	C3	6,89	2,18	1,29	1,08	1,68	2,20	5,26
3	N	B1	4,16	2,20	0,84	0,51	0,37	0,37	3,54	B1	7,32	2,47	1,32	0,82	2,79	2,81	5,48
3	HS	B2	4,30	2,07	0,87	0,50	0,35	0,35	3,44	B2							
3	HL	B3	4,20	2,19	0,84	0,52	0,33	0,32	3,61	B3	7,26	2,43	1,34	1,14	2,68	2,63	5,61
3	HL	B4	4,16	2,17	0,87	0,47	0,33	0,28	3,43	B4	7,26	2,30	1,32	1,03	2,77	2,73	5,55
3	HS	B5	4,37	2,23	0,83	0,51	0,29	0,27	3,35	B5	5,42	2,18	1,03	0,78	1,26	1,24	3,72
3	CutN	C1	4,48	2,12	0,83	0,50	0,02	0,02	3,49	C1	7,38	2,25	1,31	1,13	1,49	0,92	5,67

3	CutHS	C2	4,15	2,18	0,84	0,49	0,00	0,01	3,49	C2	5,38	2,05	1,06	0,83	1,63	1,61	3,84
3	CutHL	C3	4,19	2,13	0,83	0,52	0,04	0,03	3,53	C3	7,14	2,24	1,37	1,08	2,05	2,11	5,45
3	CutHL	C4	4,14	2,11	0,82	0,48	0,04	0,04	3,43	C4	6,86	2,22	1,35	1,15	0,96	2,09	5,34
3	CutHS	C5	4,15	2,11	0,77	0,48	0,03	0,02	3,46	C5	5,67	2,28	1,05	0,72	0,17	0,15	2,00
4	HS	B1	3,97	2,16	0,81	0,51	0,30	0,29	3,28	B1							
4	HL	B2	4,02	2,12	0,83	0,49	0,29	0,35	3,41	B2	6,91	2,18	1,21	1,11	2,03	2,89	5,32
4	N	B3	3,84	2,17	0,79	0,54	0,30	0,35	3,28	B3	6,73	2,08	1,20	0,99	2,68	2,57	5,00
4	HL	B4	3,96	2,21	0,77	0,54	0,31	0,30	3,43	B4	6,83	2,22	1,27	1,13	2,42	2,55	5,12
4	N	B5	3,84	2,12	0,78	0,50	0,30	0,33	3,23	B5	6,68	2,19	1,19	1,03	2,34	2,20	5,11
4	CutHS	C1	4,03	2,04	0,78	0,50	0,03	0,01	3,35	C1							
4	CutHL	C2	4,06	2,10	0,75	0,47	0,05	0,05	3,33	C2	7,11	2,19	1,32	1,09	1,05	1,49	5,53
4	CutN	C3	3,96	2,10	0,80	0,49	0,04	0,02	3,42	C3							
4	CutHL	C4	3,99	2,07	0,82	0,50	0,05	0,01	3,40	C4	6,91	2,25	1,27	1,15	1,42	1,61	5,23
4	CutN	C5	4,10	2,15	0,83	0,51	0,02	0,04	3,39	C5							
5	HS	B1	3,97	1,93	0,81	0,50	0,26	0,26	3,22	B1	6,64	2,29	1,17	0,92	1,24	1,28	5,06
5	HS	B2	4,13	2,08	0,83	0,50	0,33	0,30	3,37	B2	6,96	2,58	1,16	0,91	1,05	1,08	5,27
5	HL	B3	4,07	2,06	0,82	0,51	0,31	0,31	3,42	B3	7,79	2,48	1,32	1,12	2,45	2,32	6,18
5	HL	B4	4,11	2,06	0,83	0,49	0,31	0,30	3,45	B4	7,85	2,48	1,39	1,14	2,38	2,53	6,15
5	N	B5	4,01	2,03	0,81	0,49	0,30	0,33	3,36	B5	7,79	2,38	1,41	1,19	2,05	2,14	6,06
5	CutHS	C1	4,07	2,06	0,81	0,47	0,00	0,01	3,44	C1	6,72	2,53	1,18	0,95	1,64	1,68	5,07
5	CutHS	C2	4,05	2,00	0,83	0,47	0,03	0,03	3,39	C2	6,93	2,37	1,19	0,91	1,63	1,20	5,20
5	CutHL	C3	4,07	2,02	0,78	0,50	0,03	0,03	3,41	C3	7,87	2,49	1,38	1,16	2,57	2,31	6,19
5	CutHL	C4	4,09	2,04	0,84	0,52	0,03	0,02	3,40	C4	7,82	2,48	1,33	1,25	0,95	2,21	5,97
5	CutN	C5	3,90	2,00	0,79	0,48	0,04	0,03	3,25	C5	7,40	2,40	1,40	1,06	2,01	2,26	5,76
6	HL	B1	4,04	2,55	0,93	0,60	0,29	0,32	4,10	B1	7,72	2,28	1,38	0,98	2,79	2,52	4,00
6	HS	B2	4,48	2,25	0,89	0,57	0,30	0,29	3,58	B2							
6	HS	B3	3,88	2,06	0,82	0,49	0,28	0,29	3,24	B3							
6	N	B4	3,97	2,09	0,86	0,51	0,33	0,32	3,24	B4	7,82	2,46	1,35	1,20	2,56	2,51	5,94
6	N	B5	3,98	2,00	0,82	0,50	0,26	0,28	3,36	B5	7,98	2,38	1,43	1,15	2,63	2,64	6,17
6	CutHL	C1	4,36	2,21	0,93	0,55	0,02	0,02	3,63	C1	7,84	2,35	1,33	1,19	1,44	2,12	6,12
6	CutHS	C2	4,33	2,21	0,90	0,51	0,03	0,03	3,58	C2	6,94	2,54	1,19	0,87	1,61	1,65	5,33

6	CutHS	C3	3,87	1,97	0,81	0,46	0,01	0,00	3,23	C3	6,39	2,29	1,14	0,86	1,62	1,61	4,84
6	CutN	C4	4,05	1,95	0,82	0,50	0,01	0,03	3,34	C4	7,95	2,30	1,39	0,99	1,46	0,98	6,27
7	HS	B1	4,17	2,09	0,83	0,49	0,44	0,45	3,40	B1	7,10	2,16	1,31	0,95	2,31	2,01	5,46
7	HS	B2	4,19	2,06	0,84	0,46	0,40	0,43	3,57	B2	7,37	2,23	1,33	1,11	2,03	2,24	5,72
7	HL	B3	4,31	1,00	0,84	0,47	0,48	0,47	3,61	B3							
7	HL	B4	4,45	2,08	0,85	0,51	0,37	0,48	3,56	B4							
7	N	B5	4,14	2,12	0,82	0,50	0,43	0,44	3,38	B5							
7	CutHS	C1	4,49	2,08	0,84	0,48	0,03	0,03	3,47	C1	7,38	2,23	1,33	1,16	1,48	1,02	5,83
7	CutHS	C2	4,49	2,08	0,84	0,45	0,04	0,01	3,52	C2	7,21	2,39	1,31	1,07	0,18	1,61	5,56
7	CutHL	C3	4,31	2,07	0,84	0,47	0,03	0,03	3,74	C3							
7	CutHL	C4	4,04	2,09	0,81	0,48	0,02	0,03	3,42	C4							
7	CutN	C5	4,08	2,14	0,71	0,47	0,02	0,01	3,40	C5							
8	HS	B1	3,82	2,13	0,77	0,49	0,30	0,29	3,35	B1							
8	HS	B2	4,00	2,11	0,80	0,51	0,27	0,29	3,41	B2							
8	HL	B3	4,41	2,10	0,81	0,47	0,33	0,37	3,57	B3	6,98	2,20	1,33	1,08	2,56	2,32	5,39
8	HL	B4	4,05	2,10	0,80	0,49	0,38	0,33	3,50	B4	7,73	2,48	1,38	1,04	2,59	2,73	4,00
8	N	B5	4,16	2,13	0,81	0,49	0,32	0,34	3,48	B5	7,88	2,53	1,38	1,13	2,86	2,69	6,06
8	CutHS	C1	3,84	2,09	0,77	0,53	0,01	0,00	3,32	C1							
8	CutHS	C2	3,96	2,04	0,77	0,49	0,02	0,02	3,41	C2							
8	CutHL	C3	4,14	2,13	0,81	0,50	0,03	0,01	3,49	C3	7,98	2,52	1,40	1,13	1,24	2,03	6,22
8	CutHL	C4	3,86	2,13	0,80	0,52	0,02	0,02	3,19	C4							
8	CutN	C5	4,16	2,07	0,85	0,48	0,02	0,04	3,47	C5	7,87	2,52	1,40	1,21	0,94	2,12	6,41
9	HS	B1	3,86	2,16	0,81	0,55	0,25	0,26	3,30	B1	5,50	2,20	0,99	0,75	1,69	1,70	4,10
9	HS	B2	3,97	2,09	0,86	0,51	0,26	0,28	3,26	B2							
9	HL	B3	3,97	2,11	0,83	0,52	0,29	0,28	3,36	B3	7,81	2,22	1,34	1,18	2,87	2,82	6,10
9	N	B4	3,93	2,12	0,84	0,51	0,29	0,28	3,38	B4	7,53	2,25	1,35	1,15	2,63	2,26	5,80
9	CutHS	C1	3,88	2,08	0,85	0,51	0,04	0,03	3,27	C1	5,49	2,15	1,00	0,82	1,61	1,22	4,07
9	CutHS	C2	3,95	2,17	0,84	0,53	0,03	0,00	3,38	C2							
9	CutHL	C3	3,94	2,11	0,81	0,54	0,03	0,03	3,36	C3	7,84	2,25	1,38	0,87	2,68	2,45	6,11
9	CutN	C4	4,00	2,12	0,83	0,52	0,00	0,00	3,40	C4	7,81	2,26	1,35	0,91	2,48	2,42	6,06
10	HS	B1	4,34	2,00	0,80	0,52	0,35	0,37	3,68	B1	6,16	2,17	1,08	0,83	1,26	1,66	4,51

10	HS	B2	4,46	2,09	0,82	0,49	0,39	0,37	3,55	B2	6,09	2,18	1,07	0,84	1,61	1,63	4,66
10	HL	B3	4,11	2,06	0,85	0,50	0,41	0,37	3,55	B3	7,66	2,20	1,14	1,12	2,67	2,60	6,06
10	HL	B4	4,01	1,98	0,84	0,49	0,37	0,37	3,50	B4	7,57	2,17	1,29	1,13	2,63	2,48	5,93
10	N	B5	4,17	2,06	0,85	0,48	0,40	0,22	3,51	B5	7,83	2,19	1,37	1,09	2,06		6,06
10	CutHS	C1	4,18	2,05	0,83	0,49	0,02	0,03	3,45	C1							
10	CutHS	C2	4,40	2,04	0,84	0,48	0,01	0,02	3,48	C2	6,18	2,20	1,07	1,08	1,63	1,60	4,55
10	CutHL	C3	4,19	2,02	0,81	0,49	0,03	0,01	3,62	C3	7,51	2,29	1,32	1,14	1,68	1,60	5,75
10	CutHL	C4	4,19	2,01	0,83	0,47	0,01	0,02	3,64	C4	7,41	2,19	1,30	1,08	1,04	1,68	5,85
10	CutN	C5	4,04	2,09	0,83	0,48	0,02	0,04	3,43	C5							
11	HS	B1	4,48	2,14	0,85	0,48	0,38	0,39	3,54	B1							
11	HS	B2	4,17	2,10	0,82	0,51	0,39	0,37	3,53	B2							
11	HL	B3	4,36	2,04	0,81	0,48	0,39	0,36	3,56	B3	7,07	2,23	1,31	1,05	2,55	2,29	5,46
11	HL	B4	4,43	1,99	0,83	0,48	0,38	0,38	3,59	B4	7,99	2,49	1,46	1,10	2,85	2,92	6,20
11	N	B5	4,45	2,16	0,83	0,50	0,33	0,38	3,52	B5	7,37	2,58	1,43	1,14	2,95	2,24	6,57
11	CutHS	C1	4,40	2,11	0,80	0,47	0,02	0,03	3,71	C1							
11	CutHS	C2	4,16	2,10	0,83	0,48	0,00	0,04	3,59	C2							
11	CutHL	C3	4,31	2,01	0,85	0,49	0,02	0,02	3,61	C3							
11	CutHL	C4	4,45	2,11	0,81	0,48	0,02	0,01	3,67	C4	7,47	2,61	1,44	1,20	1,03	1,45	6,75
11	CutN	C5	4,16	2,10	0,81	0,51	0,02	0,04	3,40	C5	7,24	2,57	1,36	1,13	1,65	1,24	6,49
12	HS	B1	4,36	2,02	0,81	0,43	0,27	0,30	3,19	B1							
12	HS	B2	3,87	1,90	0,72	0,44	0,40	0,32	3,26	B2							
12	HL	B3	4,05	2,01	0,82	0,42	0,36	0,33	3,16	B3	7,89	2,24	1,37	1,13	2,23	2,15	6,65
12	HL	B4	4,32	1,96	0,81	0,66	0,40	0,37	3,45	B4	7,69	2,24	1,27	1,20	2,52	2,43	6,49
12	N	B5	4,16	1,92	0,81	0,41	0,33	0,38	3,21	B5	7,89	2,15	1,31	1,16	2,45	2,44	6,47
12	CutHS	C1	3,88	2,08	0,80	0,59	0,02	0,03	3,11	C1							
12	CutHS	C2	4,06	2,00	0,80	0,53	0,04	0,03	3,20	C2							
12	CutHL	C3	4,20	2,05	0,81	0,59		0,06	3,24	C3	7,81	2,20	1,39	1,05	1,63	1,40	6,62
12	CutHL	C4	4,15	2,12	0,76	0,54		0,04	3,26	C4	7,46	2,21	1,31	1,14	0,89	1,20	5,95
12	CutN	C5	3,92	2,00	0,82	0,53		0,08	3,14	C5	7,72	2,29	1,36	1,16	0,53	1,35	6,43

Anexo 2. Diferencia delta de las mediciones morfológicas de *Hyloxalus nexipus* en el día inicial y el día final de los individuos por tratamiento. Experimento (Exp), embriones (emb).

Anexo 2.1 Diferencia delta de las mediciones morfológicas de *Hyloxalus nexipus* en el día inicial y el día final de los individuos con branquias cortadas bajo normóxia (N). Experimento (Exp), embriones (emb).

Exp	Tratamiento	Emb	L. total	A. yema	A. cabeza	A. cola	Branq. izq	Branq. der	L. cuerpo cola
1	N	B4	2,923	0,088	0,442	0,588	2,528	2,429	2,029
2	N	B3	-4,084	-2,143	-0,841	-0,515	-0,285	-0,295	-3,392
3	N	B1	3,165	0,264	0,482	0,311	2,422	2,435	1,941
4	N	B3	2,888	-0,098	0,413	0,455	2,379	2,211	1,718
4	N	B5	2,848	0,076	0,406	0,526	2,043	1,870	1,873
5	N	B5	3,788	0,359	0,594	0,700	1,755	1,817	2,700
6	N	B4	3,850	0,369	0,487	0,687	2,227	2,193	2,705
6	N	B5	3,999	0,383	0,602	0,657	2,369	2,352	2,813
7	N	B5	-4,144	-2,119	-0,824	-0,503	-0,432	-0,437	-3,376
8	N	B5	3,719	0,401	0,566	0,642	2,546	2,354	2,579
9	N	B4	3,604	0,134	0,514	0,641	2,336	1,972	2,418
10	N	B5	3,663	0,136	0,528	0,604	1,659	-0,216	2,552
11	N	B5	2,925	0,429	0,606	0,647	2,624	1,861	3,049
12	N	B5	3,728	0,234	0,493	0,752	2,112	2,057	3,262
		Promedio	2,348	-0,106	0,319	0,442	1,877	1,615	1,634
		Desv. Estándar	2,767	0,871	0,492	0,418	0,989	1,067	2,172
		Error estándar	0,740	0,233	0,132	0,112	0,264	0,285	0,581

Anexo 2.2 Diferencia delta de las mediciones morfológicas de *Hyloxalus nexipus* en el día inicial y el día final de los individuos con branquias cortadas bajo hipoxia leve (HL). Experimento (Exp), embriones (emb).

Exp	Tratamiento	Emb	L. total	A. yema	A. cabeza	A. cola	Branq. izq	Branq. der	L. cuerpo cola
1	HL	B2	2,821	0,112	0,427	0,535	2,564	2,459	1,709
2	HL	B2	3,048	0,053	0,470	0,649	2,410	2,512	1,985
3	HL	B3	3,067	0,242	0,492	0,629	2,350	2,306	1,997
3	HL	B4	3,095	0,129	0,456	0,568	2,447	2,444	2,127
4	HL	B2	2,893	0,062	0,378	0,619	1,746	2,537	1,915
4	HL	B4	2,869	0,007	0,495	0,592	2,115	2,246	1,696
5	HL	B3	3,724	0,419	0,495	0,617	2,137	2,010	2,751
5	HL	B4	3,742	0,419	0,554	0,654	2,066	2,234	2,696
6	HL	B1	3,675	- 0,267	0,443	0,380	2,492	2,199	-0,095
7	HL	B3	-4,309	- 1,000	-0,836	-0,471	-0,480	-0,468	-3,613
7	HL	B4	-4,448	- 2,080	-0,850	-0,506	-0,370	-0,476	-3,561
8	HL	B3	2,568	0,105	0,525	0,611	2,230	1,949	1,825
8	HL	B4	3,676	0,383	0,585	0,552	2,207	2,396	0,503
9	HL	B3	3,844	0,110	0,509	0,655	2,582	2,535	2,733
10	HL	B3	3,545	0,141	0,287	0,621	2,261	2,229	2,508
10	HL	B4	3,556	0,186	0,444	0,636	2,260	2,113	2,430
11	HL	B3	2,709	0,183	0,498	0,564	2,159	1,928	1,901
11	HL	B4	3,555	0,498	0,627	0,616	2,470	2,541	2,609
12	HL	B3	3,843	0,229	0,542	0,712	1,869	1,826	3,481
12	HL	B4	3,375	0,282	0,462	0,540	2,116	2,055	3,042

Promedio	2,208	0,097	0,291	0,438	1,873	1,871	1,288
Desv. Estándar	2,797	2,797	2,797	2,797	2,797	2,797	2,797
Error estándar	0,753	0,753	0,753	0,753	0,753	0,753	0,753

Anexo 2.3 Diferencia delta de las mediciones morfológicas de *Hyloxalus nexipus* en el día inicial y el día final de los individuos con branquias cortadas bajo hipoxia severa (HS). Experimento (Exp), embriones (emb).

Exp	Tratamiento	Emb	L. total	A. yema	A. cabeza	A. cola	Branq. izq	Branq. der	L. cuerpo cola
1	HS	B1	2,812	0,754	0,324	0,476	0,842	0,844	1,664
1	HS	B3	1,778	0,401	0,359	0,311	0,989	1,405	1,305
2	HS	B1	-3,794	-2,153	-0,816	-0,550	-0,288	-0,259	-3,219
3	HS	B2	-4,303	-2,070	-0,865	-0,504	-0,348	-0,345	-3,435
3	HS	B5	1,045	-0,051	0,208	0,276	0,968	0,969	0,364
4	HS	B1	-3,966	-2,159	-0,805	-0,509	-0,301	-0,288	-3,279
5	HS	B1	2,669	0,354	0,365	0,424	0,977	1,015	1,838
5	HS	B2	2,827	0,495	0,327	0,410	0,717	0,782	1,894
6	HS	B2	-4,475	-2,249	-0,887	-0,574	-0,303	-0,285	-3,583
6	HS	B3	-3,882	-2,055	-0,819	-0,491	-0,282	-0,294	-3,236
7	HS	B1	2,922	0,073	0,481	0,465	1,875	1,564	2,064
7	HS	B2	3,182	0,164	0,484	0,643	1,630	1,810	2,159
8	HS	B1	-3,820	-2,125	-0,771	-0,488	-0,297	-0,289	-3,351
8	HS	B2	-4,001	-2,105	-0,799	-0,510	-0,267	-0,289	-3,410
9	HS	B1	1,641	0,042	0,188	0,204	1,435	1,438	0,793
9	HS	B2	-3,967	-2,089	-0,859	-0,511	-0,259	-0,282	-3,261
10	HS	B1	1,812	0,167	0,276	0,310	0,907	1,290	0,831

10	HS	B2	1,636	0,090	0,254	0,357	1,216	1,269	1,110
11	HS	B1	-4,479	-2,139	-0,846	-0,480	-0,377	-0,385	-3,541
11	HS	B2	-4,171	-2,096	-0,817	-0,514	-0,393	-0,366	-3,534
12	HS	B1	-4,362	-2,024	-0,812	-0,427	-0,267	-0,295	-3,186
12	HS	B2	-3,873	-1,903	-0,722	-0,443	-0,397	-0,321	-3,264
		Promedio	-1,062	-0,973	-0,270	-0,074	0,385	0,427	-1,081
		Desv. Estándar	3,259	3,259	3,259	3,259	3,259	3,259	3,259
		Error estándar	1,206	1,206	1,206	1,206	1,206	1,206	1,206

Anexo 2.4 Diferencia delta de las mediciones morfológicas de *Hyloxalus nexipus* en el día inicial y el día final de los individuos con branquias cortadas bajo normóxia (N). Experimento (Exp), embriones (emb).

Exp	Tratamiento	Emb	L. total	A. yema	A. cabeza	A. cola	Branq. izq	Branq. der	L. cuerpo cola
1	CutN	C4	2,904	0,199	0,424	0,647	1,019	1,399	1,914
2	CutN	C3	2,935	0,027	0,465	0,569	1,651	2,162	1,957
3	CutN	C1	2,901	0,128	0,487	0,634	1,471	0,897	2,187
4	CutN	C3	-3,963	-2,104	-0,798	-0,493	-0,041	-0,022	-3,422
4	CutN	C5	-4,097	-2,148	-0,827	-0,512	-0,021	-0,038	-3,393
5	CutN	C5	3,497	0,399	0,611	0,585	1,970	2,222	2,509
6	CutN	C4	3,901	0,355	0,562	0,496	1,448	0,948	2,925
7	CutN	C5	-4,078	-2,140	-0,709	-0,472	-0,021	-0,007	-3,401
8	CutN	C5	3,706	0,442	0,554	0,732	0,922	2,079	2,949
9	CutN	C4	3,813	0,146	0,525	0,397	2,471	2,421	2,665
10	CutN	C5	-4,044	-2,085	-0,829	-0,483	-0,016	-0,037	-3,426
11	CutN	C5	3,083	0,463	0,550	0,619	1,632	1,193	3,086

12	CutN	C5	3,804	0,283	0,545	0,637	0,454	1,306	3,287
		Promedio	1,105	-0,464	0,120	0,258	0,995	1,117	0,757
		Desv. Estándar	3,591	3,591	3,591	3,591	3,591	3,591	3,591
		Error estándar	1,155	1,155	1,155	1,155	1,155	1,155	1,155

Anexo 2.5 Diferencia delta de las mediciones morfológicas de *Hyloxalus nexipus* en el día inicial y el día final de los individuos con branquias cortadas bajo hipoxia leve (HL). Experimento (Exp), embriones (emb).

Exp	Tratamiento	Emb	L. total	A. yema	A. cabeza	A. cola	Branq. izq	Branq. der	L. cuerpo cola
1	CutHL	C2	2,420	0,349	0,383	0,425	0,107	0,122	1,531
2	CutHL	C2	2,812	0,083	0,467	0,561	2,083	0,966	1,768
3	CutHL	C3	2,947	0,113	0,540	0,568	2,010	2,080	1,921
3	CutHL	C4	2,711	0,110	0,538	0,673	0,918	2,050	1,907
4	CutHL	C2	3,046	0,087	0,567	0,617	0,997	1,446	2,202
4	CutHL	C4	2,926	0,185	0,457	0,658	1,371	1,597	1,826
5	CutHL	C3	3,797	0,475	0,595	0,658	2,539	2,276	2,781
5	CutHL	C4	3,732	0,436	0,489	0,733	0,921	2,189	2,575
6	CutHL	C1	3,476	0,134	0,404	0,644	1,419	2,103	2,485
7	CutHL	C3	-4,309	- 2,073	-0,844	-0,467	-0,025	-0,032	-3,740
7	CutHL	C4	-4,036	- 2,091	-0,809	-0,475	-0,016	-0,028	-3,422
8	CutHL	C3	3,838	0,394	0,592	0,627	1,212	2,016	2,733



Anexo 2.6 Diferencia delta de las mediciones morfológicas de *Hyloxalus nexipus* en el día inicial y el día final de los individuos con branquias cortadas bajo hipoxia severa (HS). Experimento (Exp), embriones (emb).

Exp	Tratamiento	Emb	L. total	A. yema	A. cabeza	A. cola	Branq. izq	Branq. der	L. cuerpo cola
1	CutHS	C1	1,337	0,461	0,351	0,198	0,058	0,091	0,487
1	CutHS	C3	1,685	0,431	0,247	0,326	0,139	0,137	0,866
2	CutHS	C1	-3,866	-2,188	-0,837	-0,562	-0,010	-0,024	-3,257
3	CutHS	C2	1,238	-0,129	0,222	0,338	1,623	1,592	0,346
3	CutHS	C5	1,521	0,176	0,273	0,235	0,141	0,132	-1,460
4	CutHS	C1	-4,030	-2,039	-0,778	-0,495	-0,029	-0,011	-3,348
5	CutHS	C1	2,656	0,471	0,368	0,473	1,635	1,677	1,622
5	CutHS	C2	2,889	0,368	0,356	0,449	1,592	1,173	1,809
6	CutHS	C2	2,606	0,325	0,294	0,357	1,579	1,622	1,750
6	CutHS	C3	2,520	0,322	0,327	0,397	1,606	1,604	1,610
7	CutHS	C1	2,892	0,150	0,493	0,676	1,448	0,995	2,363
7	CutHS	C2	2,715	0,316	0,469	0,627	0,139	1,592	2,036
8	CutHS	C1	-3,837	-2,093	-0,772	-0,525	-0,007	-0,004	-3,323
8	CutHS	C2	-3,962	-2,044	-0,767	-0,492	-0,021	-0,022	-3,407
9	CutHS	C1	1,619	0,073	0,145	0,312	1,568	1,196	0,795
9	CutHS	C2	-3,946	-2,169	-0,841	-0,531	-0,028	-0,004	-3,376
10	CutHS	C1	-4,176	-2,049	-0,826	-0,489	-0,021	-0,028	-3,454
10	CutHS	C2	1,779	0,162	0,228	0,596	1,618	1,585	1,071
11	CutHS	C1	-4,401	-2,108	-0,800	-0,474	-0,015	-0,032	-3,708
11	CutHS	C2	-4,157	-2,104	-0,829	-0,483	-0,004	-0,044	-3,587
12	CutHS	C1	-3,881	-2,083	-0,804	-0,591	-0,018	-0,029	-3,113
12	CutHS	C2	-4,060	-1,996	-0,801	-0,534	-0,042	-0,034	-3,197
1	CutHS	C1	1,337	0,461	0,351	0,198	0,058	0,091	0,487
1	CutHS	C3	1,685	0,431	0,247	0,326	0,139	0,137	0,866
2	CutHS	C1	-3,866	-2,188	-0,837	-0,562	-0,010	-0,024	-3,257



**Anexo 3.** Supervivencia de individuos de *Hyloxalus nexipus* por experimento.

Especies	Fecha (Día inicial)	Fecha día final	Número de emb.	Control	HL	HS	CutN	CutHL	CutN	
H. nexipus001	25/11/2017	29/11/2017	9	1	1	0,5	1,0	1	0,5	
H. nexipus002	09/12/2017	13/12/2017	8	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0	
H. nexipus003	14/12/2017	18/12/2017	11	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0	
H. nexipus004	15/12/2017	19/12/2017	11	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	
H. nexipus005	10/01/2018	15/01/2018	11	1,0	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	
H. nexipus006	14/01/2018	19/01/2018	10	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	
H. nexipus007	28/01/2018	01/02/2018	11	1,0	0,5	0,0	0,0	1,0	0,0	
H. nexipus008	10/02/2018	14/02/2018	11	1,0	1,0	0,0	1,0	0,5	0,5	
H. nexipus009	12/02/2018	18/02/2018	8	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0	
H. nexipus010	21/02/2018	26/02/2018	11	1,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	
H. nexipus011	04/03/2018	09/02/2018	11	1,0	1,0	0,0	1,0	0,5	0,0	
H. nexipus012	13/03/2018	17/03/2018	11	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0
Promedio				1,0	0,8	1,0	0,2	0,8	0,9	0,3

Desv. Estándar Error estándar	0	0,387	0,144	0,325	0,452	0,194	0,443
	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1

**Anexo 4.** Proporción de individuos de *Hyloxalus nexipus* que formaron el cristalino por experimento.

Presencia cristalino (Día final)						
	N	HL	HS	CutN	CutHL	CutN
<i>H. nexipus</i> 001	1,0	1	0,0	1,0	1	0,0
<i>H. nexipus</i> 002		1,0		1,0	1,0	
<i>H. nexipus</i> 003	1,0	1,0		1,0	1,0	0,0
<i>H. nexipus</i> 004	1,0	1,0			1,0	
<i>H. nexipus</i> 005	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0
<i>H. nexipus</i> 006	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0
<i>H. nexipus</i> 007	1,0		1,0			1,0
<i>H. nexipus</i> 008	1,0	1,0		1,0	1,0	
<i>H. nexipus</i> 009	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0
<i>H. nexipus</i> 010	1,0		0,0		1,0	0,0
<i>H. nexipus</i> 011	1,0	1,0		1,0	1,0	
<i>H. nexipus</i> 012	1,0	1,0		1,0	1,0	
Promedio	1,0	0,9	0,2	0,9	1,0	0,3
Desviación estándar	0	0,316	0,408	0,333	0	0,487
Error estándar	0,0	0,1	0,2	0,1	0,0	0,2

**Anexo 5.** Proporción de individuos de *Hyloxalus nexipus* que formaron edema por experimento.

Presencia Edema (Día final)						
	N	HL	HS	CutN	CutHL	CutN
<i>H. nexipus</i> 001	0,0	0	0,5	0,0	1	0,5
<i>H. nexipus</i> 002		0,0	0,0	1,0	0,0	
<i>H. nexipus</i> 003	0,0	0,0		0,0	0,0	0,0
<i>H. nexipus</i> 004	0,0	0,0			0,0	
<i>H. nexipus</i> 005	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5
<i>H. nexipus</i> 006	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>H. nexipus</i> 007	0,0	0,0	0,0			0,0
<i>H. nexipus</i> 008	0,0	0,0		0,0	0,0	
<i>H. nexipus</i> 009	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>H. nexipus</i> 010	0,0	0,0	0,0		0,0	0,0
<i>H. nexipus</i> 011	0,0	0,0		0,0	0,0	
<i>H. nexipus</i> 012	0,0	0,0		0,0	0,0	
Promedio	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
Desv. estándar	0	0	0,188	0,333	0,301	0,243

Error estándar	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
----------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

**Anexo 6.** Proporción de individuos de *Hyloxalus nexipus* que desarrollaron aleta por experimento.

	Presencia aleta (Día final)					
	N	HL	HS	CutN	CutHL	CutN
<i>H. nexipus</i> 001	1	1	0,0	1,0	1	0,0
<i>H. nexipus</i> 002	1,0	1,0	0,0	0,0	1,0	
<i>H. nexipus</i> 003	1	1,0		1,0	1,0	0,0
<i>H. nexipus</i> 004	1,0	1,0			1,0	
<i>H. nexipus</i> 005	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0
<i>H. nexipus</i> 006	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
<i>H. nexipus</i> 007	1,0	1,0	1,0			1,0
<i>H. nexipus</i> 008	1,0	1,0		1,0	1,0	
<i>H. nexipus</i> 009	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0
<i>H. nexipus</i> 010	1,0	1,0	0,0		1,0	0,0

<i>H. nexipus</i> 011	1,0	1,0		1,0	1,0	
<i>H. nexipus</i> 012	1,0	1,0		1,0	1,0	
Promedio	1,0	1,0	0,3	0,9	1,0	0,1
Desv. estándar	0	0	0,487	0,333	0	0,377
Error estándar	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,1

**Anexo 7. ANOVA del ancho de la yema de *Hyloxalus nexipus* y prueba de significación de Tukey.**

**ANOVA**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,025	6	,004	,169	,984
Dentro de grupos	2,018	81	,025		
Total	2,043	87			

**Pruebas post hoc**

**Comparaciones múltiples**

HSD Tukey

---

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
CutHL	CutN	-,00613	,06577	1,000	-,2050	,1927
	CutHS	-,00852	,06028	1,000	-,1908	,1737
	HL	,03670	,05423	,994	-,1273	,2007
	N	,00681	,06028	1,000	-,1754	,1891
	HS	-,01309	,06363	1,000	-,2055	,1793
CutN	CutHL	,00613	,06577	1,000	-,1927	,2050
	CutHS	-,00239	,06960	1,000	-,2128	,2081
	HL	,04283	,06444	,994	-,1520	,2377
	N	,01294	,06960	1,000	-,1975	,2234
	HS	-,00696	,07252	1,000	-,2262	,2123
CutHS	CutHL	,00852	,06028	1,000	-,1737	,1908
	CutN	,00239	,06960	1,000	-,2081	,2128
	HL	,04522	,05883	,987	-,1326	,2231
	N	,01533	,06444	1,000	-,1795	,2102
	HS	-,00457	,06759	1,000	-,2089	,1998
HL	CutHL	-,03670	,05423	,994	-,2007	,1273
	CutN	-,04283	,06444	,994	-,2377	,1520
	CutHS	-,04522	,05883	,987	-,2231	,1326
	N	-,02989	,05883	,999	-,2078	,1480
	HS	-,04979	,06225	,984	-,2380	,1385
N	CutHL	-,00681	,06028	1,000	-,1891	,1754
	CutN	-,01294	,06960	1,000	-,2234	,1975
	CutHS	-,01533	,06444	1,000	-,2102	,1795
	HL	,02989	,05883	,999	-,1480	,2078
	HS	-,01990	,06759	1,000	-,2243	,1845

HS	CutHL	,01309	,06363	1,000	-,1793	,2055
	CutN	,00696	,07252	1,000	-,2123	,2262
	CutHS	,00457	,06759	1,000	-,1998	,2089
	HL	,04979	,06225	,984	-,1385	,2380
	N	,01990	,06759	1,000	-,1845	,2243

**Anexo 8. ANOVA de la variación del ancho de la yema en el tiempo en *Hyloxalus nexipus* y prueba de significación de Tukey.**

**ANOVA**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,438	5	,088	,697	,628
Dentro de grupos	8,428	67	,126		
Total	8,867	72			

**Pruebas post hoc**

**Comparaciones múltiples**

HSD Tukey

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de		Sig.	95% de intervalo de confianza	
		medias (I-J)	Error estándar		Límite inferior	Límite superior
CutHL	CutN	-,04368	,14778	1,000	-,4772	,3899
	CutHS	-,13343	,13892	,929	-,5410	,2741

	HL	,10476	,12354	,957	-,2577	,4672
	N	-,06677	,13892	,997	-,4743	,3408
	HS	-,00887	,14778	1,000	-,4424	,4247
CutN	CutHL	,04368	,14778	1,000	-,3899	,4772
	CutHS	-,08975	,15942	,993	-,5574	,3779
	HL	,14844	,14621	,911	-,2805	,5774
	N	-,02309	,15942	1,000	-,4908	,4446
	HS	,03481	,16720	1,000	-,4557	,5253
CutHS	CutHL	,13343	,13892	,929	-,2741	,5410
	CutN	,08975	,15942	,993	-,3779	,5574
	HL	,23818	,13724	,514	-,1645	,6408
	N	,06666	,15123	,998	-,3770	,5103
	HS	,12455	,15942	,970	-,3431	,5922
HL	CutHL	-,10476	,12354	,957	-,4672	,2577
	CutN	-,14844	,14621	,911	-,5774	,2805
	CutHS	-,23818	,13724	,514	-,6408	,1645
	N	-,17153	,13724	,811	-,5742	,2311
	HS	-,11363	,14621	,970	-,5426	,3153
N	CutHL	,06677	,13892	,997	-,3408	,4743
	CutN	,02309	,15942	1,000	-,4446	,4908
	CutHS	-,06666	,15123	,998	-,5103	,3770
	HL	,17153	,13724	,811	-,2311	,5742
	HS	,05790	,15942	,999	-,4098	,5256
HS	CutHL	,00887	,14778	1,000	-,4247	,4424
	CutN	-,03481	,16720	1,000	-,5253	,4557
	CutHS	-,12455	,15942	,970	-,5922	,3431
	HL	,11363	,14621	,970	-,3153	,5426
	N	-,05790	,15942	,999	-,5256	,4098

---

**Anexo 9. ANOVA de la variación de la longitud total en el tiempo en *Hyloxalus nexipus* y prueba de significación de Tukey.**

**ANOVA**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2,270	6	,378	50,433	,000
Dentro de grupos	,608	81	,008		
Total	2,878	87			

**Pruebas post hoc**

**Comparaciones múltiples**

HSD Tukey

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Control	CutHL	,36121*	,03393	,000	,2586	,4638
	CutN	,34250*	,03893	,000	,2248	,4602
	CutHS	,56296*	,03616	,000	,4536	,6723
	HL	,35348*	,03315	,000	,2532	,4537
	N	,33867*	,03616	,000	,2293	,4480

	HS	,54487*	,03785	,000	,4304	,6593
CutHL	CutN	-,01872	,03609	,999	-,1278	,0904
	CutHS	,20175*	,03308	,000	,1017	,3018
	HL	-,00773	,02976	1,000	-,0977	,0823
	N	-,02254	,03308	,993	-,1226	,0775
	HS	,18366*	,03492	,000	,0781	,2892
CutN	CutHL	,01872	,03609	,999	-,0904	,1278
	CutHS	,22046*	,03820	,000	,1050	,3360
	HL	,01098	,03536	1,000	-,0959	,1179
	N	-,00383	,03820	1,000	-,1193	,1117
	HS	,20237*	,03980	,000	,0820	,3227
CutHS	CutHL	-,20175*	,03308	,000	-,3018	-,1017
	CutN	-,22046*	,03820	,000	-,3360	-,1050
	HL	-,20948*	,03228	,000	-,3071	-,1119
	N	-,22429*	,03536	,000	-,3312	-,1174
	HS	-,01809	,03709	,999	-,1302	,0941
HL	CutHL	,00773	,02976	1,000	-,0823	,0977
	CutN	-,01098	,03536	1,000	-,1179	,0959
	CutHS	,20948*	,03228	,000	,1119	,3071
	N	-,01481	,03228	,999	-,1124	,0828
	HS	,19139*	,03416	,000	,0881	,2947
N	CutHL	,02254	,03308	,993	-,0775	,1226
	CutN	,00383	,03820	1,000	-,1117	,1193
	CutHS	,22429*	,03536	,000	,1174	,3312
	HL	,01481	,03228	,999	-,0828	,1124
	HS	,20620*	,03709	,000	,0941	,3183
HS	CutHL	-,18366*	,03492	,000	-,2892	-,0781
	CutN	-,20237*	,03980	,000	-,3227	-,0820
	CutHS	,01809	,03709	,999	-,0941	,1302

HL	-,19139*	,03416	,000	-,2947	-,0881
N	-,20620*	,03709	,000	-,3183	-,0941

**Anexo 10. ANOVA de la variación del ancho de la cola en el tiempo en *Hyloxalus nexipus* y prueba de significación de Tukey.**

**ANOVA**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,563	5	,113	9,645	,000
Dentro de grupos	,828	71	,012		
Total	1,391	76			

**Pruebas post hoc**

**Comparaciones múltiples**

HSD Tukey

---

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CutHL	CutN	,00131	,04501	1,000	-,1305	,1331
	CutHS	,17643*	,04125	,001	,0556	,2972
	HL	-,00591	,03711	1,000	-,1146	,1028
	N	-,00176	,04125	1,000	-,1226	,1191
	HS	,19878*	,04354	,000	,0712	,3263
CutN	CutHL	-,00131	,04501	1,000	-,1331	,1305
	CutHS	,17512*	,04763	,006	,0356	,3146
	HL	-,00722	,04410	1,000	-,1364	,1219
	N	-,00307	,04763	1,000	-,1426	,1364
	HS	,19747*	,04963	,002	,0521	,3428
CutHS	CutHL	-,17643*	,04125	,001	-,2972	-,0556
	CutN	-,17512*	,04763	,006	-,3146	-,0356
	HL	-,18234*	,04025	,000	-,3002	-,0644
	N	-,17819*	,04410	,002	-,3073	-,0490
	HS	,02235	,04625	,997	-,1131	,1578
HL	CutHL	,00591	,03711	1,000	-,1028	,1146

	CutN	,00722	,04410	1,000	-,1219	,1364
	CutHS	,18234*	,04025	,000	,0644	,3002
	N	,00416	,04025	1,000	-,1138	,1221
	HS	,20469*	,04260	,000	,0799	,3295
N	CutHL	,00176	,04125	1,000	-,1191	,1226
	CutN	,00307	,04763	1,000	-,1364	,1426
	CutHS	,17819*	,04410	,002	,0490	,3073
	HL	-,00416	,04025	1,000	-,1221	,1138
	HS	,20053*	,04625	,001	,0651	,3360
HS	CutHL	-,19878*	,04354	,000	-,3263	-,0712
	CutN	-,19747*	,04963	,002	-,3428	-,0521
	CutHS	-,02235	,04625	,997	-,1578	,1131
	HL	-,20469*	,04260	,000	-,3295	-,0799
	N	-,20053*	,04625	,001	-,3360	-,0651

---

**Anexo 11. ANOVA de la variación del ancho de la cabeza en el tiempo en *Hyloxalus nexipus* y prueba de significación de Tukey.**

**ANOVA**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,751	5	,150	16,997	,000
Dentro de grupos	,627	71	,009		
Total	1,378	76			

**Pruebas post hoc**

**Comparaciones múltiples**

HSD Tukey

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CutHL	CutN	-,00504	,03916	1,000	-,1197	,1097

	CutHS	,23724*	,03589	,000	,1321	,3424
	HL	,03466	,03229	,890	-,0599	,1292
	N	,00795	,03589	1,000	-,0972	,1131
	HS	,21784*	,03789	,000	,1069	,3288
CutN	CutHL	,00504	,03916	1,000	-,1097	,1197
	CutHS	,24228*	,04144	,000	,1209	,3637
	HL	,03970	,03837	,905	-,0727	,1521
	N	,01298	,04144	1,000	-,1084	,1344
	HS	,22287*	,04318	,000	,0964	,3494
CutHS	CutHL	-,23724*	,03589	,000	-,3424	-,1321
	CutN	-,24228*	,04144	,000	-,3637	-,1209
	HL	-,20258*	,03503	,000	-,3052	-,1000
	N	-,22930*	,03837	,000	-,3417	-,1169
	HS	-,01941	,04024	,997	-,1373	,0985
HL	CutHL	-,03466	,03229	,890	-,1292	,0599
	CutN	-,03970	,03837	,905	-,1521	,0727
	CutHS	,20258*	,03503	,000	,1000	,3052
	N	-,02672	,03503	,973	-,1293	,0759
	HS	,18317*	,03707	,000	,0746	,2917
N	CutHL	-,00795	,03589	1,000	-,1131	,0972
	CutN	-,01298	,04144	1,000	-,1344	,1084
	CutHS	,22930*	,03837	,000	,1169	,3417
	HL	,02672	,03503	,973	-,0759	,1293
	HS	,20989*	,04024	,000	,0920	,3278
HS	CutHL	-,21784*	,03789	,000	-,3288	-,1069
	CutN	-,22287*	,04318	,000	-,3494	-,0964
	CutHS	,01941	,04024	,997	-,0985	,1373
	HL	-,18317*	,03707	,000	-,2917	-,0746
	N	-,20989*	,04024	,000	-,3278	-,0920

**Anexo 12. ANOVA de la variación de la longitud tronco-cola en el tiempo en *Hyloxalus nexipus* y prueba de significación de Tukey.**

**ANOVA**

Log\_longitud\_tronco\_cola

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3,606	6	,601	22,537	,000
Dentro de grupos	2,107	79	,027		
Total	5,713	85			

**Pruebas post hoc**

**Comparaciones múltiples**

HSD Tukey

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Control	CutHL	,40970*	,06396	,000	,2162	,6032
	CutN	,36626*	,07340	,000	,1442	,5883
	CutHS	,71213*	,06964	,000	,5014	,9228
	HL	,45491*	,06319	,000	,2637	,6461
	N	,39063*	,06817	,000	,1844	,5969
	HS	,67994*	,07135	,000	,4640	,8958

CutHL	CutN	-,04345	,06805	,995	-,2493	,1624
	CutHS	,30243*	,06396	,000	,1089	,4960
	HL	,04520	,05688	,985	-,1269	,2173
	N	-,01908	,06236	1,000	-,2078	,1696
	HS	,27023*	,06583	,002	,0710	,4694
CutN	CutHL	,04345	,06805	,995	-,1624	,2493
	CutHS	,34587*	,07340	,000	,1238	,5680
	HL	,08865	,06732	,842	-,1150	,2923
	N	,02437	,07201	1,000	-,1935	,2423
	HS	,31368*	,07504	,001	,0866	,5407
CutHS	CutHL	-,30243*	,06396	,000	-,4960	-,1089
	CutN	-,34587*	,07340	,000	-,5680	-,1238
	HL	-,25723*	,06319	,002	-,4484	-,0660
	N	-,32150*	,06817	,000	-,5278	-,1152
	HS	-,03220	,07135	,999	-,2481	,1837
HL	CutHL	-,04520	,05688	,985	-,2173	,1269
	CutN	-,08865	,06732	,842	-,2923	,1150
	CutHS	,25723*	,06319	,002	,0660	,4484
	N	-,06428	,06157	,942	-,2506	,1220
	HS	,22503*	,06508	,015	,0281	,4219
N	CutHL	,01908	,06236	1,000	-,1696	,2078
	CutN	-,02437	,07201	1,000	-,2423	,1935
	CutHS	,32150*	,06817	,000	,1152	,5278
	HL	,06428	,06157	,942	-,1220	,2506
	HS	,28931*	,06992	,002	,0777	,5009
HS	CutHL	-,27023*	,06583	,002	-,4694	-,0710
	CutN	-,31368*	,07504	,001	-,5407	-,0866
	CutHS	,03220	,07135	,999	-,1837	,2481
	HL	-,22503*	,06508	,015	-,4219	-,0281

---

N	-,28931*	,06992	,002	-,5009	-,0777
---	----------	--------	------	--------	--------

---

**Anexo 13. ANOVA de la variación de la longitud de la branquia izquierda en el tiempo en *Hyloxalus nexipus* y prueba de significación de Tukey.**

### ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2,743	5	,549	6,721	,000
Dentro de grupos	5,795	71	,082		
Total	8,538	76			

### Pruebas post hoc

#### Comparaciones múltiples

##### HSD Tukey

		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
(I) Tratamientos	(J) Tratamientos				Límite inferior	Límite superior

CutHL	CutN	-,04832	,11904	,999	-,3970	,3003
	CutHS	,25512	,10910	,193	-,0644	,5747
	HL	-,27852	,09816	,063	-,5660	,0090
	N	-,27691	,10910	,127	-,5965	,0426
	HS	,02762	,11517	1,000	-,3097	,3649
CutN	CutHL	,04832	,11904	,999	-,3003	,3970
	CutHS	,30343	,12598	,167	-,0656	,6724
	HL	-,23021	,11663	,367	-,5718	,1114
	N	-,22860	,12598	,463	-,5976	,1404
	HS	,07593	,13127	,992	-,3085	,4604
CutHS	CutHL	-,25512	,10910	,193	-,5747	,0644
	CutN	-,30343	,12598	,167	-,6724	,0656
	HL	-,53364*	,10647	,000	-,8455	-,2218
	N	-,53203*	,11663	,000	-,8736	-,1904
	HS	-,22750	,12233	,435	-,5858	,1308
HL	CutHL	,27852	,09816	,063	-,0090	,5660
	CutN	,23021	,11663	,367	-,1114	,5718
	CutHS	,53364*	,10647	,000	,2218	,8455
	N	,00161	,10647	1,000	-,3102	,3135
	HS	,30614	,11268	,084	-,0239	,6362
N	CutHL	,27691	,10910	,127	-,0426	,5965
	CutN	,22860	,12598	,463	-,1404	,5976
	CutHS	,53203*	,11663	,000	,1904	,8736
	HL	-,00161	,10647	1,000	-,3135	,3102
	HS	,30453	,12233	,141	-,0538	,6628
HS	CutHL	-,02762	,11517	1,000	-,3649	,3097
	CutN	-,07593	,13127	,992	-,4604	,3085
	CutHS	,22750	,12233	,435	-,1308	,5858
	HL	-,30614	,11268	,084	-,6362	,0239

N	-,30453	,12233	,141	-,6628	,0538
---	---------	--------	------	--------	-------

**Anexo 14. ANOVA de la variación de la longitud de la branquia derecha en el tiempo en *Hyloxalus nexipus* y prueba de significación de Tukey.**

### ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,926	5	,385	5,940	,000
Dentro de grupos	4,539	70	,065		
Total	6,465	75			

### Pruebas post hoc

#### Comparaciones múltiples

#### HSD Tukey

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza
------------------	------------------	-------------------------------	-------------------	------	----------------------------------

						Límite inferior	Límite superior
CutHL	CutN	-,02479	,10610	1,000	-,3357	,2861	
	CutHS	,27496	,09725	,065	-,0100	,5599	
	HL	-,19144	,08750	,256	-,4478	,0649	
	N	-,16947	,09974	,537	-,4617	,1228	
	HS	,08033	,10265	,970	-,2205	,3811	
CutN	CutHL	,02479	,10610	1,000	-,2861	,3357	
	CutHS	,29975	,11229	,095	-,0293	,6288	
	HL	-,16665	,10396	,599	-,4713	,1380	
	N	-,14468	,11446	,803	-,4801	,1907	
	HS	,10512	,11700	,946	-,2377	,4480	
CutHS	CutHL	-,27496	,09725	,065	-,5599	,0100	
	CutN	-,29975	,11229	,095	-,6288	,0293	
	HL	-,46641*	,09490	,000	-,7445	-,1883	
	N	-,44443*	,10630	,001	-,7559	-,1330	
	HS	-,19463	,10904	,482	-,5141	,1249	
HL	CutHL	,19144	,08750	,256	-,0649	,4478	
	CutN	,16665	,10396	,599	-,1380	,4713	
	CutHS	,46641*	,09490	,000	,1883	,7445	
	N	,02198	,09746	1,000	-,2636	,3075	
	HS	,27178	,10044	,087	-,0225	,5661	
N	CutHL	,16947	,09974	,537	-,1228	,4617	
	CutN	,14468	,11446	,803	-,1907	,4801	
	CutHS	,44443*	,10630	,001	,1330	,7559	
	HL	-,02198	,09746	1,000	-,3075	,2636	
	HS	,24980	,11127	,231	-,0762	,5758	
HS	CutHL	-,08033	,10265	,970	-,3811	,2205	
	CutN	-,10512	,11700	,946	-,4480	,2377	

CutHS	,19463	,10904	,482	-,1249	,5141
HL	-,27178	,10044	,087	-,5661	,0225
N	-,24980	,11127	,231	-,5758	,0762

**Anexo 15. ANOVA de la proporción de supervivientes por tratamiento de *Hyloxalus nexipus* y prueba de significación de Tukey.**

<b>ANOVA</b>					
Proporción de supervivencia					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	7,708	6	1,285	12,529	,000
Dentro de grupos	7,896	77	,103		
Total	15,604	83			

**Pruebas post hoc**

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: Proporción de supervivencia

HSD Tukey

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza
------------------	------------------	-------------------------------	-------------------	------	----------------------------------

						Límite inferior	Límite superior
Control	N	.1667	.1307	,861		-.229	.562
	HL	.0417	.1307	1,000		-.354	.437
	HS	.8333*	.1307	,000		.438	1.229
	CutN	.2500	.1307	,479		-.146	.646
	CutHL	.0833	.1307	,995		-.312	.479
	CutHS	.6667*	.1307	,000		.271	1.062
N	HL	-.1250	.1307	,962		-.521	.271
	HS	.6667*	.1307	,000		.271	1.062
	CutN	.0833	.1307	,995		-.312	.479
	CutHL	-.0833	.1307	,995		-.479	.312
	CutHS	.5000*	.1307	,005		.104	.896
	HL	N	.1250	.1307	,962		-.271
HS		.7917*	.1307	,000		.396	1.187
CutN		.2083	.1307	,687		-.187	.604
CutHL		.0417	.1307	1,000		-.354	.437
CutHS		.6250*	.1307	,000		.229	1.021
HS		N	-.6667*	.1307	,000		-1.062
	HL	-.7917*	.1307	,000		-1.187	-.396
	CutN	-.5833*	.1307	,001		-.979	-.188
	CutHL	-.7500*	.1307	,000		-1.146	-.354
	CutHS	-.1667	.1307	,861		-.562	.229
	CutN	N	-.0833	.1307	,995		-.479
HL		-.2083	.1307	,687		-.604	.187
HS		.5833*	.1307	,001		.188	.979
CutHL		-.1667	.1307	,861		-.562	.229
CutHS		.4167*	.1307	,033		.021	.812
CutHL		N	.0833	.1307	,995		-.312

	HL	-.0417	.1307	1,000	-.437	.354
	HS	.7500*	.1307	,000	.354	1.146
	CutN	.1667	.1307	,861	-.229	.562
	CutHS	.5833*	.1307	,001	.188	.979
CutHS	N	-.5000*	.1307	,005	-.896	-.104
	HL	-.6250*	.1307	,000	-1.021	-.229
	HS	.1667	.1307	,861	-.229	.562
	CutN	-.4167*	.1307	,033	-.812	-.021
	CutHL	-.5833*	.1307	,001	-.979	-.188

**Anexo 16. ANOVA de la proporción de individuos que desarrollaron cristalino por tratamiento de *Hyloxalus nexipus* y prueba de significación de Tukey.**

#### ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5,767	6	,961	14,000	,000
Dentro de grupos	4,051	59	,069		
Total	9,818	65			

**Pruebas post hoc**

### Comparaciones múltiples

HSD Tukey

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Control	N	,00000	,10938	1,000	-,3339	,3339
	HL	,10000	,11219	,973	-,2424	,4424
	HS	,83333*	,13101	,000	,4334	1,2332
	CutN	,11111	,11554	,960	-,2416	,4638
	CutHL	,00000	,10938	1,000	-,3339	,3339
	CutHS	,71429*	,12462	,000	,3339	1,0947
N	HL	,10000	,11449	,975	-,2495	,4495
	HS	,83333*	,13298	,000	,4274	1,2392
	CutN	,11111	,11777	,964	-,2484	,4706
	CutHL	,00000	,11173	1,000	-,3410	,3410
	CutHS	,71429*	,12669	,000	,3276	1,1010
	HL	N	-,10000	,11449	,975	-,4495
HS		,73333*	,13531	,000	,3203	1,1463
CutN		,01111	,12039	1,000	-,3564	,3786
CutHL		-,10000	,11449	,975	-,4495	,2495
CutHS		,61429*	,12913	,000	,2201	1,0084
HS	N	-,83333*	,13298	,000	-1,2392	-,4274
	HL	-,73333*	,13531	,000	-1,1463	-,3203
	CutN	-,72222*	,13810	,000	-1,1437	-,3007
	CutHL	-,83333*	,13298	,000	-1,2392	-,4274
	CutHS	-,11905	,14578	,982	-,5640	,3259

CutN	N	-,11111	,11777	,964	-,4706	,2484
	HL	-,01111	,12039	1,000	-,3786	,3564
	HS	,72222*	,13810	,000	,3007	1,1437
	CutHL	-,11111	,11777	,964	-,4706	,2484
	CutHS	,60317*	,13205	,000	,2001	1,0062
CutHL	N	,00000	,11173	1,000	-,3410	,3410
	HL	,10000	,11449	,975	-,2495	,4495
	HS	,83333*	,13298	,000	,4274	1,2392
	CutN	,11111	,11777	,964	-,2484	,4706
	CutHS	,71429*	,12669	,000	,3276	1,1010
CutHS	N	-,71429*	,12669	,000	-1,1010	-,3276
	HL	-,61429*	,12913	,000	-1,0084	-,2201
	HS	,11905	,14578	,982	-,3259	,5640
	CutN	-,60317*	,13205	,000	-1,0062	-,2001
	CutHL	-,71429*	,12669	,000	-1,1010	-,3276

---

**Anexo 17. ANOVA de la proporción de individuos que formaron edema por tratamiento de *Hyloxalus nexipus* y prueba de significación de Tukey.**

ANOVA					
Presencia_edema					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,170	6	,028	,536	,779
Dentro de grupos	3,286	62	,053		
Total	3,457	68			

**Pruebas post hoc**

**Comparaciones múltiples**

HSD Tukey

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Control	N	,08333	,09610	,976	-,2095	,3762
	HL	,08333	,09399	,973	-,2031	,3697
	HS	,01190	,10949	1,000	-,3217	,3455
	CutN	-,02778	,10152	1,000	-,3371	,2816
	CutHL	-,00758	,09610	1,000	-,3004	,2853
	CutHS	-,05952	,10949	,998	-,3932	,2741

N	HL	,00000	,09610	1,000	-,2928	,2928
	HS	-,07143	,11131	,995	-,4106	,2678
	CutN	-,11111	,10348	,933	-,4264	,2042
	CutHL	-,09091	,09817	,967	-,3900	,2082
	CutHS	-,14286	,11131	,857	-,4820	,1963
HL	N	,00000	,09610	1,000	-,2928	,2928
	HS	-,07143	,10949	,995	-,4051	,2622
	CutN	-,11111	,10152	,927	-,4205	,1982
	CutHL	-,09091	,09610	,963	-,3837	,2019
	CutHS	-,14286	,10949	,847	-,4765	,1908
HS	N	,07143	,11131	,995	-,2678	,4106
	HL	,07143	,10949	,995	-,2622	,4051
	CutN	-,03968	,11602	1,000	-,3932	,3139
	CutHL	-,01948	,11131	1,000	-,3587	,3197
	CutHS	-,07143	,12306	,997	-,4464	,3036
CutN	N	,11111	,10348	,933	-,2042	,4264
	HL	,11111	,10152	,927	-,1982	,4205
	HS	,03968	,11602	1,000	-,3139	,3932
	CutHL	,02020	,10348	1,000	-,2951	,3355
	CutHS	-,03175	,11602	1,000	-,3853	,3218
CutHL	N	,09091	,09817	,967	-,2082	,3900
	HL	,09091	,09610	,963	-,2019	,3837
	HS	,01948	,11131	1,000	-,3197	,3587
	CutN	-,02020	,10348	1,000	-,3355	,2951
	CutHS	-,05195	,11131	,999	-,3911	,2872
CutHS	N	,14286	,11131	,857	-,1963	,4820
	HL	,14286	,10949	,847	-,1908	,4765
	HS	,07143	,12306	,997	-,3036	,4464
	CutN	,03175	,11602	1,000	-,3218	,3853

---

CutHL	,05195	,11131	,999	-,2872	,3911
-------	--------	--------	------	--------	-------

---

**Anexo 18. ANOVA de la proporción de individuos que desarrollaron aleta caudal por tratamiento de *Hyloxalus nexipus* y prueba de significación de Tukey.**

### ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6,768	6	1,128	22,386	,000
Dentro de grupos	3,175	63	,050		
Total	9,943	69			

**Pruebas post hoc**

**Comparaciones múltiples**

## HSD Tukey

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
N	HL	.000	.092	1,000	-.28	.28
	HS	.714*	.107	,000	.39	1.04
	CutN	.111	.099	,919	-.19	.41
	CutHL	.000	.094	1,000	-.29	.29
	CutN	.857*	.107	,000	.53	1.18
HL	N	.000	.092	1,000	-.28	.28
	HS	.714*	.107	,000	.39	1.04
	CutN	.111	.099	,919	-.19	.41
	CutHL	.000	.094	1,000	-.29	.29
	CutN	.857*	.107	,000	.53	1.18
HS	N	-.714*	.107	,000	-1.04	-.39
	HL	-.714*	.107	,000	-1.04	-.39
	CutN	-.603*	.113	,000	-.95	-.26
	CutHL	-.714*	.109	,000	-1.04	-.38

	CutN	.143	.120	,895	-.22	.51
CutN	N	-.111	.099	,919	-.41	.19
	HL	-.111	.099	,919	-.41	.19
	HS	.603*	.113	,000	.26	.95
	CutHL	-.111	.101	,925	-.42	.20
	CutN	.746*	.113	,000	.40	1.09
CutHL	N	.000	.094	1,000	-.29	.29
	HL	.000	.094	1,000	-.29	.29
	HS	.714*	.109	,000	.38	1.04
	CutN	.111	.101	,925	-.20	.42
	CutN	.857*	.109	,000	.53	1.19
CutN	N	-.857*	.107	,000	-1.18	-.53
	HL	-.857*	.107	,000	-1.18	-.53
	HS	-.143	.120	,895	-.51	.22
	CutN	-.746*	.113	,000	-1.09	-.40
	CutHL	-.857*	.109	,000	-1.19	-.53

---

**Anexo 19. Identificación de nidos por experimentos.**

<b>Date (first day)</b>	<b>Species</b>	<b>Experiment Number</b>	<b>Embryos for experiments</b>	<b>Clutch data (date, number of eggs, terrarium)</b>	<b>Date (last day)</b>
25/11/2017	Hyloxalus nexipus	1	9	T2789- 9eggs- 20Nov2017	29/11/2017
09/12/2017	Hyloxalus nexipus	2	8	T3402- 8eggs- 04Dic2017	13/12/2017
14/12/2017	Hyloxalus nexipus	3	11	T3569-12eggs- 11Dic2017	18/12/2017
15/12/2017	Hyloxalus nexipus	4	11	T3325-12eggs- 11Dic2017	19/12/2017
10/01/2018	Hyloxalus nexipus	5	11	T3569-12eggs- 05Ene2018	15/01/2018
14/01/2018	Hyloxalus nexipus	6	10	T3569-10eggs- 09Ene2018	19/01/2018
28/01/2018	Hyloxalus nexipus	7	11	T3569-12eggs- 23Ene2018	01/02/2018
10/02/2018	Hyloxalus nexipus	8	11	T3569-11eggs- 5Feb2019	14/02/2018
12/02/2018	Hyloxalus nexipus	9	8	T3569-8eggs-8Feb2018	18/02/2018
21/02/2018	Hyloxalus nexipus	10	11	T3843-12eggs- 16Feb2018	26/02/2018
04/03/2018	Hyloxalus nexipus	11	11	T3402-12eggs- 26Feb2018	09/02/2018
13/03/2018	Hyloxalus nexipus	12	11	T4124-13eggs- 12Mar2018	17/03/2018