

**Desarrollo neural, somitogénesis y morfología interna de los
embriones de *Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates auratus*
(Anura: Dendrobatidae)**

Francisca Hervás Sotomayor y Eugenia M. del Pino¹

¹Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Ciencias Biológicas,
Laboratorio de Biología del Desarrollo
Quito, Ecuador. edelpino@puce.edu.ec

Recibido: 23, 05, 2013; aceptado: 23, 08, 2013

RESUMEN.- Se analizaron y compararon las características de la neurulación, morfología interna de los embriones desde la néurula hasta la eclosión del renacuajo y el modo de miogénesis de dos especies de ranas de la familia Dendrobatidae (*Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates auratus*) con otras especies de la misma familia y *Xenopus laevis*. Se realizó este análisis debido a que los huevos de *H. vertebralis* y *D. auratus* tienen el tamaño más grande detectado hasta ahora en la familia Dendrobatidae (2.6 y 3.5 mm de diámetro, respectivamente). La morfología interna de los embriones y la neurulación de *H. vertebralis* y *D. auratus* fueron similares a lo observado en *X. laevis* y otros Dendrobatidae. Se observó retraso en la diferenciación del cerebro en estas especies en comparación con *X. laevis*. La miogénesis de *H. vertebralis* y *D. auratus* ocurre por interdigitación celular como en *Bombina variegata* (Bombinatoridae), cuatro especies adicionales de Dendrobatidae, dos especies de Leiuperidae y una especie de Hemiphractidae. El estudio comparativo permite documentar la diversidad de programas del desarrollo entre los anuros y contribuir al conocimiento de la fauna ecuatoriana.

PALABRAS CLAVES: mesodermo presomítico, miogénesis, neurulación, somitogénesis, *Xenopus laevis*

ABSTRACT.- The features of neurulation and internal morphology of the embryos and the mode of myogenesis were analyzed and compared from the neurula stage until tadpole hatching in two species of the family Dendrobatidae (*Hyloxalus vertebralis* and *Dendrobates auratus*) in comparison with other species of the same family and *Xenopus laevis*. This analysis was undertaken because the eggs of *H. vertebralis* and *D. auratus* are among the largest detected in the family Dendrobatidae (2.6 and 3.5 mm of diameter, respectively). Internal morphology and neurulation in *H. vertebralis* and *D. auratus* were

similar with the features of *X. laevis* and other Dendrobatidae. There was retardation in the differentiation of the brain in these species in comparison with *X. laevis*. The mode of myogenesis of *H. vertebralis* and *D. auratus* occurs by cell interdigitation as found in *Bombina variegata* (Bombinatoridae), four additional species of Dendrobatidae, two species of Leiuperidae, and one species of Hemiphractidae. The comparative analysis allows documentation of the diversity of developmental programs among anurans and represents a contribution to the better knowledge of the ecuatorian fauna.

KEYWORDS: myogenesis, neurulation, presomitic mesoderm, somitogenesis, *Xenopus laevis*

INTRODUCCIÓN

Los mecanismos del desarrollo temprano de los vertebrados son altamente conservados (Pourquié, 2003); pero se han encontrado diferencias en estos procesos, al comparar especies cercanamente relacionadas (Pourquié, 2001). Incluso dentro de los anfibios existen diferencias fundamentales en el desarrollo temprano (Elinson y del Pino, 2012). Lo que ha llevado a sugerir que la historia evolutiva de cada especie puede haber determinado una divergencia en los procesos del desarrollo de los anfibios (Radice *et al.*, 1989). Esta divergencia puede ser el resultado de la larga historia filogenética de los anfibios, o de las adaptaciones sufridas por los embriones para poder desarrollarse en diferentes ambientes (Elinson y del Pino, 2012).

En este estudio se analizaron las características de la neurulación, morfología interna de los embriones desde la néurula hasta la eclosión del renacuajo y el modo de miogénesis de embriones de *Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates auratus*, familia

Dendrobatidae. Las ranas dendrobátidas están caracterizadas por grandes diferencias en el tamaño de sus huevos de acuerdo con las especies. Los embriones de las especies analizadas se desarrollan a partir de huevos muy grandes (2.6–3.5 mm de diámetro). Su desarrollo es lento, en comparación con el desarrollo rápido descrito para *Xenopus laevis*, la rana modelo de la Biología del Desarrollo (del Pino *et al.*, 2007; del Pino *et al.*, 2004). El desarrollo temprano de varias especies de Dendrobatidae, ha sido estudiado con amplitud en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). Las investigaciones realizadas en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE, sobre la embriogénesis de varias especies de la familia Dendrobatidae, han aportado con información invaluable para el estudio comparativo del desarrollo embrionario temprano (Elinson y del Pino, 2012).

Hyloxalus vertebralis y *D. auratus* tienen una distribución geográfica diferente. *Hyloxalus vertebralis* es una rana ecuatoriana

endémica, que habita en los bosques nublados de Los Andes del sur del Ecuador (Coloma *et al.*, 2011). Además, *D. auratus* se distribuye en Centroamérica y la parte norte de Suramérica (Solís *et al.*, 2004). Las dos especies depositan sus huevos en nidos terrestres sobre la hojarasca. Los embriones reciben cuidado parental por parte del macho, y en el momento de la eclosión, este los lleva en su espalda hacia una fuente de agua (Coloma *et al.*, 2011; Solís *et al.*, 2004). El diámetro del huevo de *H. vertebralis* es de aproximadamente 2.6 mm y el huevo de *D. auratus* es más grande (3.5 mm de diámetro). La velocidad del desarrollo de las dos especies se asemeja a la de otros dendrobátidos (del Pino *et al.*, 2007).

En los anfibios, como en otros vertebrados, el desarrollo del sistema nervioso se inicia con la formación del tubo neural (Harrington *et al.*, 2009). Los primeros indicios de la neurulación, en los anfibios, corresponden a la formación de la placa neural que es la región dorsal del ectodermo que se encuentra por encima del notocordio. En los bordes laterales de la placa neural se elevan los pliegues neurales, los mismos que finalmente se juntan y fusionan en la línea media para formar el tubo neural. El tubo neural se diferenciará en las partes del cerebro y el cordón espinal en estadios más avanzados del desarrollo (Wolpert *et al.*, 2007).

La somitogénesis es el desarrollo de los somitas a partir del mesodermo paraxial localizado a cada lado de la línea media del cuerpo (Mallo *et al.*, 2009; Pourquié, 2003). Los somitas se generan en sentido rostro-

caudal y son bloques de células que se separan de manera secuencial y sincrónica del mesodermo presomítico (Radice *et al.*, 1989). De los somitas se originarán los tejidos óseo, cartilaginoso, muscular y la dermis (Krneta-Stankic *et al.*, 2010; Mallo *et al.*, 2009; Wolpert *et al.*, 2007; Radice *et al.*, 1989).

El proceso de diferenciación de los mioblastos que formarán las fibras musculares se conoce como miogénesis (Radice *et al.*, 1989). La miogénesis en *X. laevis* ocurre por rotación celular (Radice *et al.*, 1989; Youn y Malacinski, 1981; Hamilton, 1969). Se han encontrado modelos adicionales de miogénesis en otros anfibios (Radice *et al.*, 1989). Los mioblastos pueden interdigitarse, fusionarse o formar rosetas de acuerdo con las especies (Radice *et al.*, 1989). Las diferencias en el patrón de somitogénesis podrían estar ligadas a las diversas estrategias reproductivas que presentan los anfibios (Radice *et al.*, 1989). Además, es probable que los diversos patrones de miogénesis provean ventajas funcionales a cada especie o representen historias naturales específicas de cada linaje (Fan *et al.*, 2001). Por eso el estudio comparativo de la somitogénesis dentro de los linajes puede proporcionar información filogenética invaluable (Smetanick *et al.*, 2000).

El modo de miogénesis por interdigitación celular ha sido descrito originalmente para *Bombina variegata* (Kiełbówna, 1981). En este modo, el mesodermo presomítico y los somitas formados recientemente consisten de numerosos mioblastos, que son pequeños, redondeados y sin arreglo específico. Conforme avanza el desarrollo, los mioblastos

se alargan e interdigitan, hasta finalmente alcanzar la longitud del somita y quedar paralelos al notocordio (Kielbówna, 1981). Este modo de miogénesis también ha sido detectado en los embriones de *Gastrotheca riobambae* (Hemiphractidae), *Engystomops coloradorum*, *Engystomops randi* (Leiuperidae), y en las especies de Dendrobatidae: *Epipedobates anthonyi*; *Epipedobates boulengeri*; *Epipedobates machalilla* y *Epipedobates tricolor* (del Pino *et al.*, 2007; Moya, 2005; del Pino *et al.*, 2004; Gatherer y del Pino, 1992).

En esta investigación se utilizó un marco comparativo con respecto a otros dendrobátidos y a *Xenopus laevis*. Este trabajo aporta información complementaria al estudio de los eventos del desarrollo temprano y al mejor conocimiento de las características del desarrollo de anuros ecuatorianos. Cabe resaltar que *H. vertebralis* es una especie en peligro crítico de extinción (Coloma *et al.*, 2011) y por lo mismo es de particular interés documentar su desarrollo embrionario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares adultos de *Hyloxalus vertebralis* fueron colectados en Sevilla de Oro, provincia del Azuay por el personal de la División de Anfibios del Museo de Zoología de la PUCE y los adultos de *Dendrobates auratus* provienen de una donación del Zoológico de Atlanta, Georgia de Estados Unidos. Las ranas fueron mantenidas en la mencionada División de Anfibios del Museo de Zoología de la PUCE y su programa de mantenimiento en cautiverio de ranas, "Balsa de los sapos". Las posturas de estas dos

especies fueron donadas al Laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE para la realización de este trabajo.

Los embriones fueron mantenidos en cámaras húmedas a temperatura ambiente del laboratorio, que fluctuó entre 18 a 23° C. Se analizó la morfología desde la néurula hasta la eclosión del renacuajo. La determinación de los estadios del desarrollo así como el cultivo y procesamiento de los embriones fue de acuerdo con lo descrito para *E. machalilla* (del Pino *et al.*, 2004). Para analizar la morfología de los embriones, estos fueron fijados en el reactivo de Smith. Se observó la morfología externa y se realizaron secciones transversales, sagitales y horizontales de los embriones con un Vibratomo Oxford. Las secciones fueron teñidas con el tinte fluorescente Hoechst 33 258, el cual se acopla al ADN y posibilita la detección de núcleos celulares. Los embriones y secciones se observaron con los microscopios Stemi SV6 y AxioObserver. Z1 que permite microscopía de fluorescencia (Carl Zeiss, Overkochen, Alemania). Se realizó microfotografía mediante las cámaras AxioCam asociadas a ambos microscopios y el programa de adquisición de imágenes Axiovision versión 4.6.3 (Carl Zeiss, Overkochen, Alemania). Las imágenes fueron editadas con el programa Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Incorporated).

RESULTADOS

Morfología interna de los embriones de *Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates auratus* desde la neurulación hasta la eclosión del renacuajo.- La morfología

interna de la néurula de *H. vertebralis* (Fig. 1A-C) y *D. auratus* (no se muestra) fueron similares. En ambas especies, el inicio de la neurulación estuvo marcado por la formación de la placa neural en la zona dorsal de la néurula temprana (estadio 14). En este estadio (Fig. 1A), en los bordes laterales de la placa neural se observaron los pliegues neurales elevados y por debajo de la placa neural, en la zona media, se observó el notocordio (Fig. 1A). En la néurula media (estadio 15; Fig. 1B), se observó que los pliegues neurales se han acercado en la línea media del cuerpo

(Fig. 1B). En la néurula tardía (estadio 16; Fig. 1C), se observó el tubo neural resultante de la fusión de los pliegues neurales (Fig. 1C). Durante los estadios de neurulación se pudo distinguir el ectodermo que formará la piel, el endodermo que cubre el techo del arquenterón y el mesodermo que formará los somitas, ubicado a los lados del notocordio. Una vez finalizado el proceso de neurulación, en los embriones de *H. vertebralis* y *D. auratus*, se pudo observar los derivados de las tres capas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo.

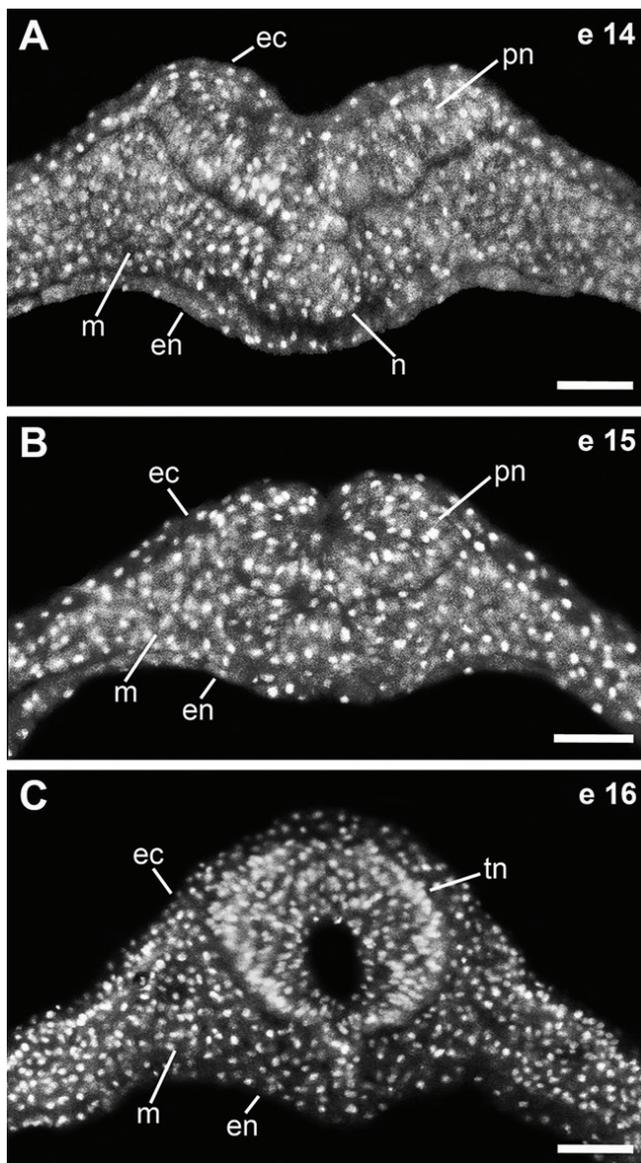


Figura 1. Morfología interna de la néurula de *H. vertebralis*. Las imágenes en A-C corresponden a secciones transversales teñidas con el tinte fluorescente Hoechst 33258 para detectar los núcleos celulares. Las secciones están orientadas con la región dorsal hacia arriba. Los estadios representados en esta y las siguientes figuras se muestran en la esquina superior derecha. (A) Néurula temprana. Se observan los pliegues neurales, el notocordio y el mesodermo presomítico, circundados por el ectodermo en la región dorsal y el endodermo en la región ventral. (B) Néurula media. Se observa que los pliegues neurales se han acercado en la línea media del cuerpo. (C) Néurula tardía. Se observa el tubo neural cerrado. El notocordio no está presente en (B) debido a que la sección es de una región caudal del embrión; por el contrario la sección que se muestra en (C) es rostral al inicio del notocordio. Las barras en A, B y C corresponden a 100 μ m. Abreviaturas: e, estadio; ec, ectodermo; en, endodermo; m, mesodermo; n, notocordio; pn, pliegues neurales; tn, tubo neural.

La morfología interna de embriones más avanzados se muestra en la figura 2A-D para *D. auratus* y figura 3A-D para *H. vertebralis*. En los embriones de *D. auratus*, durante el estadio de los arcos branquiales (estadio 18; Fig. 2A) se pudieron observar los pronefros y los somitas, estructuras que derivan del mesodermo intermedio y paraxial, respectivamente (Fig. 2A).

En el estadio de branquias en desarrollo (Estadio 22; Fig. 2B), se observaron las branquias primarias y los arcos mandibular e hioideo. Además se pudo apreciar las células de yema del embrión (Fig. 2B). Finalmente, en el estadio de desarrollo completo de las branquias (estadio 23; Figs. 2C y D) se observaron las estructuras mucho más desarrolladas que en estadios anteriores.

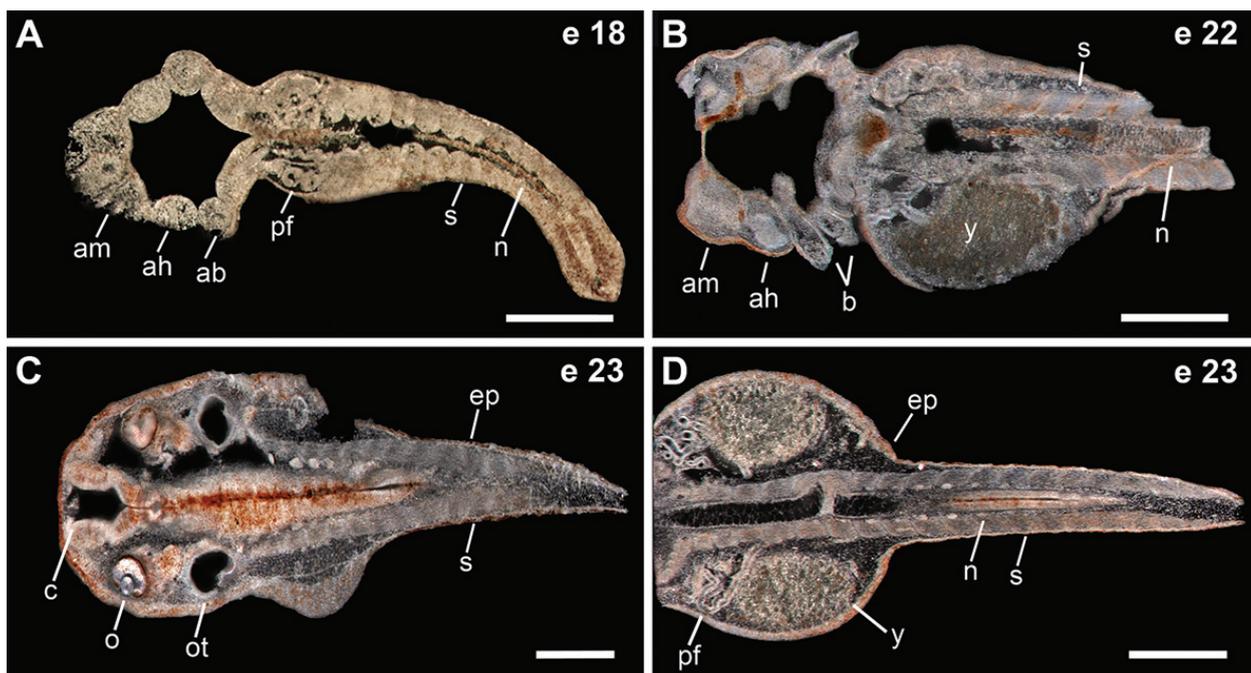


Figura 2. Morfología interna de los embriones en estadios de organogénesis de *D. auratus*. La región rostral en todas las imágenes está orientada hacia la izquierda. (A) Sección horizontal de un embrión del estadio de arcos branquiales. La sección fue realizada a través de los somitas y del notocordio. Se observan los pronefros y los arcos mandibular, hioideo y branquial. (B) Sección horizontal de un embrión del estadio de branquias en desarrollo. La sección fue realizada a través de los somitas y el notocordio. Se observan las branquias primarias y las células de yema del embrión. (C) Sección horizontal de un embrión del estadio de desarrollo completo de las branquias. La sección fue realizada a través del cerebro embrionario y los somitas. Se pueden observar los ojos y los otocistos del embrión. (D) Sección horizontal de un embrión del estadio de desarrollo completo de las branquias. La sección fue realizada a través de las células de yema y el notocordio. Se observan los pronefros y los somitas. Las secciones en las imágenes C y D corresponden al mismo embrión. Las barras en A, B, C y D corresponden a 500 μ m. Abreviaturas: ab, arco branquial; ah, arco hioideo; am, arco mandibular; b, branquias primarias; c, cerebro; e, estadio; ep, epidermis; n, notocordio; o, ojo; ot, otocisto; pf, pronefros; s, somita; y, células de yema.

En este estadio se identificaron algunos derivados del ectodermo neural como las vesículas cerebrales, los ojos y los otocistos

del embrión. Además se observó que el ectodermo de piel se había diferenciado en la epidermis. Durante estos estadios de

organogénesis, el embrión se ha alargado para gradualmente adquirir la forma de un renacuajo (Figs. 2C y D).

Durante los estadios avanzados de *H. vertebralis*, se distinguieron estructuras similares a las observadas en *D. auratus*. En *H. vertebralis*, en el estadio de los arcos branquiales (estadio 18; Fig. 3A), se pudo

observar que la parte anterior del tubo neural se había diferenciado en tres vesículas cerebrales: cerebro anterior, cerebro medio y cerebro posterior. Además se observaron los otocistos (Fig. 3A). Durante el estadio de branquias en desarrollo (estadio 22; Fig. 3B), se identificaron los ojos y los otocistos. Además se pudo identificar a las branquias primarias y la gran masa de las células de

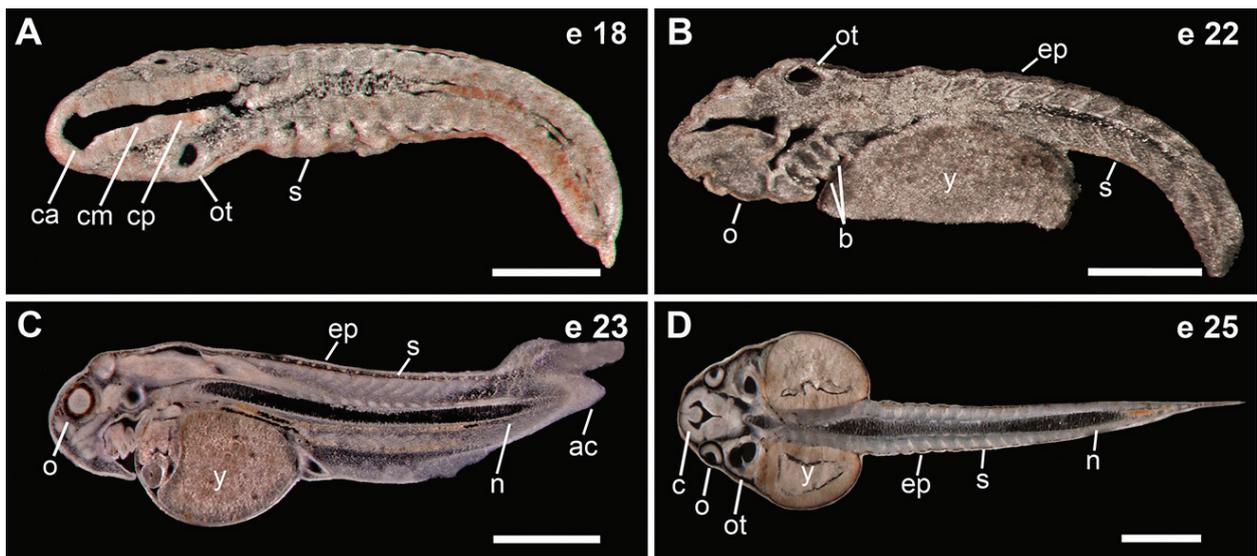


Figura 3. Morfología interna de los embriones en estadios de organogénesis de *H. vertebralis*. La región rostral en todas las imágenes está orientada hacia la izquierda. (A) Sección horizontal de un embrión del estadio de arcos branquiales. La sección fue realizada a través de los somitas. Se pueden observar las vesículas cerebrales y los otocistos. (B) Sección horizontal de un embrión del estadio de branquias en desarrollo. La sección fue realizada a través de las branquias primarias y los somitas. Se observan los otocistos y las células de yema del embrión. (C) Sección sagital de un embrión del estadio de desarrollo completo de las branquias. La sección fue realizada a través de las células de yema y los somitas. Se observan los ojos, el notocordio y la aleta caudal del embrión. (D) Sección horizontal de un embrión a la eclosión. La sección fue realizada a través de la yema y los somitas. Se observan el cerebro, los ojos y los otocistos del embrión. Las barras en A, B, C y D corresponden a 1000 μ m. Abreviaturas: ac, aleta caudal; b, branquias primarias; c, cerebro; ca, cerebro anterior; cm, cerebro medio; cp; cerebro posterior; e, estadio; ep, epidermis; n, notocordio; o, ojo; ot; otocisto; s, somita; y células de yema.

yema (Fig. 3B). En el estadio de desarrollo completo de las branquias (estadio 23; Fig. 3C) y el estadio a eclosión (estadio 25; Fig. 3D) se identificaron la epidermis, los ojos, los otocistos y el cerebro del embrión.

Además se detectó una gran cantidad de células de yema. El embrión se había alargado considerablemente y en la cola se detectó la aleta caudal (Figs. 3C y D).

Tabla 1.
Miogénesis en anuros

Familias y especies	Diámetro del huevo (mm) ^a	Tiempo de gastrulación (hrs) ^b	Modo de miogénesis ^c (referencias) ^d
Pipidae			
<i>X. laevis</i>	1.3	14	rc (1, 2)
Bombinatoridae			
<i>B. variegata</i>	2.0	25	ic (2)
Hemiphraetidae			
<i>G. riobambae</i>	3.0	336	ic (3)
Leiuperidae			
<i>E. randi</i>	1.1	24	ic (4)
<i>E. coloradorum</i>	1.3	24	ic (4)
Dendrobatidae			
<i>E. machalilla</i>	1.6	96	ic (4)
<i>E. anthonyi</i>	2.0	96	ic (4)
<i>E. tricolor</i>	2.0	96	ic (4)
<i>E. boulengeri</i>	2.0	96	ic (5)
<i>H. vertebralis</i>	2.6	96	ic (6)
<i>D. auratus</i>	3.5	96	ic (6)

a De acuerdo con: del Pino et al., 2007; Moya, 2005; Rafinska, 1991.

b Tiempo desde la fertilización hasta el final de la gastrulación (del Pino et al., 2007; Michael, 1981).

c Abreviaturas: rc, rotación celular; ic, interdigitación celular.

dReferencias: 1 = Hamilton, 1969; 2 = Kiełbówna, 1981;

3 = Gatherer y del Pino, 1992; 4 = del Pino et al., 2007;

5 = Moya, 2005; 6 = Este estudio.

Morfología de los somitas de *Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates auratus*.- Las características de la somitogénesis de *H. vertebralis* (Fig. 4A-C') y *D. auratus* (no se muestran) fueron similares. La morfología de los somitas de *H. vertebralis* se muestra en la figura 4A-C y los esquemas correspondientes se muestran en la figura 4A'-C'. Durante el estadio previo a la segmentación de los somitas (estadio 13), el mesodermo paraxial estaba conformado por células redondeadas y desorganizadas

(no se muestra). Este patrón se observó durante la neurulación cuando ya se habían formado los primeros somitas (no se muestra) y se mantuvo en los somitas y mesodermo presomítico del estadio de yema de la cola (Estadio 17; Fig. 4A, A').

En el estadio de los arcos branquiales (Estadio 18; Fig. 4B, B') se observó diferencias en los somitas de acuerdo con su posición respecto del mesodermo presomítico. En secciones horizontales de

embriones de este estadio, se observó la presencia de 15 somitas en un embrión de *H. vertebralis* y 12 somitas en uno de *D. auratus*. El análisis de estas secciones demostró que el mesodermo presomítico y los cuatro a cinco somitas más caudales consistieron de células redondeadas y sin ningún arreglo definido como se observó en el estadio 17 (Fig. 4A, A'). En los siguientes tres a cuatro somitas en dirección rostral se detectó que los

mioblastos se habían alargado e interdigitado pero no alcanzaban la longitud del somita (ver somita derecho Fig. 4B-B'). Los cinco a seis somitas más rostrales contenían células que ya se habían alargado y alcanzado la longitud del somita y estaban orientadas de manera paralela con respecto al notocordio (ver somita izquierdo Fig. 4B-B'). Todas las células de los somitas fueron mononucleadas en este estadio (Fig. 4B y B').

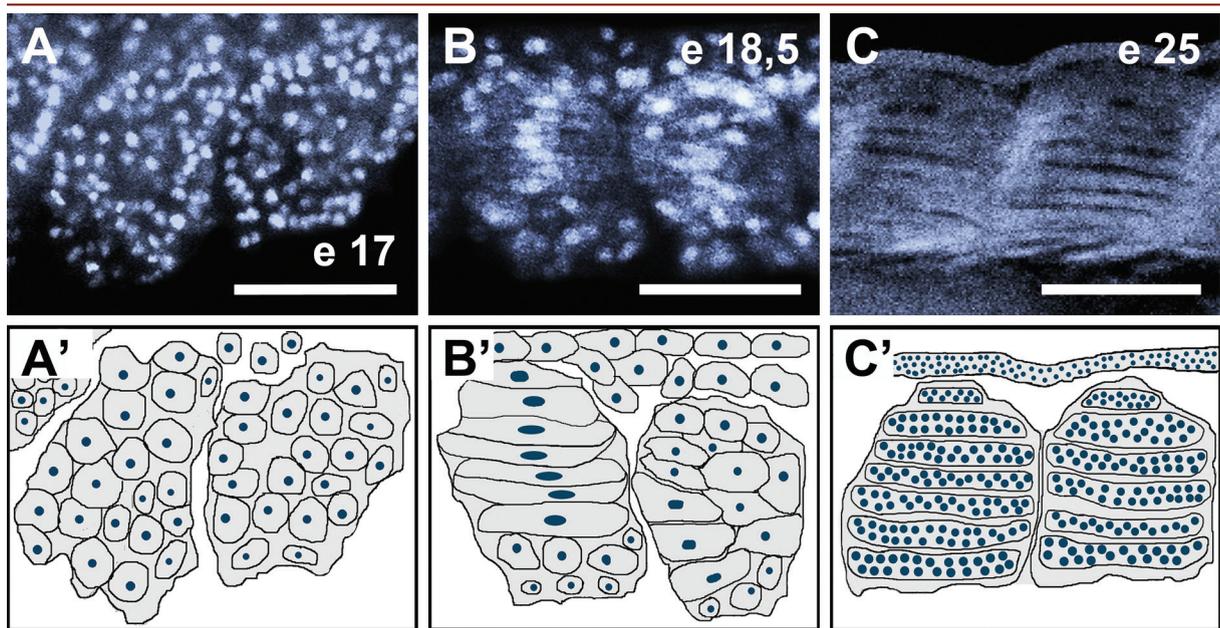


Figura 4. Morfología de los somitas de *H. vertebralis*. En todas las imágenes la región rostral está orientada hacia la izquierda y el notocordio hacia abajo. Las imágenes en A-C corresponden a secciones horizontales teñidas con el tinte fluorescente Hoechst 33258 para detectar los núcleos celulares y las imágenes A'-C' son diagramas explicativos de cada imagen. (A-A') Sección y su diagrama de dos somitas del estadio de yema de la cola. Se observan las células redondeadas y desordenadas que componen los somitas. (B-B') Sección y su diagrama de dos somitas del estadio de arcos branquiales. Se observa que el somita más rostral contiene células mononucleadas que se han alargado y han alcanzado la longitud del somita. El somita más caudal contiene células que han empezado a alargarse e intercalarse. (C-C') Sección y su diagrama de dos somitas del embrión a la eclosión. Se observa que los somitas contienen miotúbulos alargados y multinucleados. Las barras en A, B y C corresponden a 100 μ m. Abreviatura: e, estadio.

Durante el estadio a la eclosión (estadio 25; Fig. 4C-C') se observó que el miotoma constaba de fibras multinucleadas, alargadas en sentido rostro-caudal. El tamaño de las fibras alcanzaba la longitud del somita y

las fibras musculares estaban orientadas de manera paralela con respecto al notocordio. Las características de la somitogénesis de *D. auratus* (no se muestran) fueron similares a las descritas para *H. vertebralis* (Fig. 4C y C').

DISCUSIÓN

Morfología interna de los embriones, desarrollo neural y formación de somitas en *Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates auratus*.- Las especies analizadas en este estudio presentan notables diferencias en relación con el gran tamaño de sus huevos respecto a otras especies de la familia Dendrobatidae (Tabla 1). En este estudio se encontró que los procesos de neurulación y somitogénesis y la morfología interna de los embriones de *H. vertebralis* y *D. auratus* corresponden a los patrones descritos para varias especies de la familia Dendrobatidae (Venegas-Ferrín *et al.*, 2010; del Pino *et al.*, 2007; del Pino *et al.*, 2004; Benítez y del Pino, 2002). Muchos de los eventos de la organogénesis se encuentran conservados dentro de los vertebrados. En las ranas dendrobátidas estudiadas, la diferenciación de las capas embrionarias es similar a los eventos descritos para *X. laevis* y para otros anfibios. Sin embargo, los resultados sugieren que existen algunas diferencias en *H. vertebralis* y *D. auratus* como se detalla más adelante. Estas diferencias pueden ser el resultado de la estrategia reproductiva, la tasa de desarrollo y el tamaño del huevo (Tabla 1). Por lo cual es necesario el análisis comparativo de los eventos de organogénesis en ranas con diferentes tasas de desarrollo y tamaño de sus huevos. Debido a que los embriones de las ranas no son transparentes, se dificulta determinar la tasa del desarrollo neural y la formación de somitas en embriones vivos. Se debe recalcar que para la mayoría de especies analizadas, el bajo número de embriones disponibles para estudio es igualmente un factor limitante.

Como metodología alternativa para determinar aspectos temporales del desarrollo en relación con otros eventos del desarrollo embrionario, se ha utilizado el pareamiento de eventos de la formación del notocordio con el cerramiento del blastoporo, y el avance del desarrollo neural con el número de somitas en seis especies de ranas, que incluyen entre otras a *E. machalilla* y *E. tricolor* (de la familia Dendrobatidae) y a *X. laevis* (Sáenz-Ponce *et al.*, 2012). En embriones de especies con desarrollo rápido, como *X. laevis*, el alargamiento del notocordio ocurre más tempranamente respecto al cerramiento del blastoporo en comparación con las especies de desarrollo lento tales como las ranas Dendrobatidae. El desarrollo de las ramas de la cresta neural cranial está acelerado en relación con la formación de los somitas en las especies de desarrollo rápido y está retrasado en las ranas cuyo desarrollo es lento. Por el contrario, el tiempo del cerramiento del tubo neural no está acoplado con la formación de los somitas. Estos cambios parecen ser el resultado de diferencias temporales en el avance de los módulos del desarrollo, que en las especies de desarrollo rápido se inician con el alargamiento del notocordio durante la gastrulación. Las diferencias encontradas pueden estar relacionadas con el requerimiento de desarrollar de modo rápido a los renacuajos de vida libre en especies de desarrollo acuático consideradas rápidas (Sáenz-Ponce *et al.*, 2012).

El desarrollo neural de *H. vertebralis* y *D. auratus*, concuerda con los patrones morfológicos descritos para *X. laevis* y

E. machalilla (Harrington *et al.*, 2009; del Pino *et al.*, 2004). En las especies de anuros estudiados, la neurulación se inicia con la formación de la placa neural y la elevación de los pliegues neurales durante la néurula temprana. A medida que avanza el proceso de neurulación, los pliegues neurales se acercan, se fusionan en la línea media dorsal y el tubo neural se cierra (Fig. 1). La morfología de la placa neural, los pliegues neurales, el tubo neural y el notocordio de *H. vertebralis* y *D. auratus* es similar a las características morfológicas descritas para *E. machalilla* y para otros dendrobátidos estudiados (del Pino *et al.*, 2007; del Pino *et al.*, 2004). La similitud del patrón de neurulación en las ranas de la familia Dendrobatidae con relación a *X. laevis* sugiere que el tamaño del huevo no influye en el proceso de neurulación.

En los vertebrados, el sistema nervioso central se diferencia a partir del tubo neural y la región anterior dará origen a las partes del cerebro (Pierani y Wassef, 2009; Gilbert, 2003). En *X. laevis*, la diferenciación del cerebro se inicia en el estadio de yema de la cola (estadio 17; Youn, *et al.*, 1980). Por el contrario, en *H. vertebralis* y *D. auratus* la diferenciación del cerebro se detectó a partir del estadio de los arcos branquiales (Estadio 18; Fig. 2 y 3). Estas observaciones sugieren un retraso en la diferenciación cerebral en *H. vertebralis* y *D. auratus*, con respecto a *X. laevis*. Sin embargo, se requieren análisis adicionales, mediante marcadores neurales específicos, para determinar diferencias en la expresión de genes neurales, como se ha observado en otros eventos del desarrollo

de las ranas dendrobátidas (Venegas-Ferrín *et al.*, 2010; del Pino *et al.*, 2007; del Pino *et al.*, 2004; Benítez y del Pino, 2002).

Somitogénesis en *Hyloxalus vertebralis* y *Dendrobates auratus*.- Los procesos de somitogénesis no son conservados en los anfibios y no se ha encontrado relación entre el modo de miogénesis y la estrategia reproductiva (Tabla 1; Radice *et al.*, 1989). En *X. laevis*, los somitas se diferencian mediante el modo de miogénesis denominado por rotación celular (Tabla 1; Kielbówna, 1981; Hamilton, 1969). En contraste, en *B. variegata*, la miogénesis ocurre por interdigitación celular (Kielbówna, 1981). En las ranas ecuatorianas, que han sido analizadas de las familias Hemiphractidae, Leiuperidae y Dendrobatidae, se ha detectado que el único patrón de miogénesis es por interdigitación celular (Tabla 1; del Pino *et al.*, 2007; Moya, 2005). La miogénesis de *H. vertebralis* y *D. auratus* coincide con el patrón descrito para *B. variegata*, *E. machalilla* y otros Dendrobatidae (Fig. 4; Tabla 1). El presente estudio comparativo demuestra que el patrón de miogénesis por interdigitación celular es común a seis especies de la familia Dendrobatidae que difieren grandemente en el tamaño de sus huevos (Tabla 1). La larga historia filogenética de los anfibios ha permitido la diversidad de programas del desarrollo (Elinson y del Pino, 2012). Por esta razón, el estudio comparativo permite transparentar la variación en los eventos del desarrollo embrionario. Además este trabajo aporta información al conocimiento de las características del desarrollo de anuros ecuatorianos.

AGRADECIMIENTOS

Se expresa agradecimiento a los colaboradores del Laboratorio de Biología del Desarrollo de la PUCE por su ayuda durante la realización de este estudio y en particular a Andrés Garcés por su ayuda con los gráficos. Se agradece a los miembros de la División de Anfibios del Museo de Zoología de la PUCE y su programa “Balsa de los sapos” por la donación de posturas de *H. vertebralis* y *D. auratus*. Este trabajo recibió el apoyo de becas de investigación de la PUCE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benítez M y del Pino EM. 2002. Expression of Brachyury during development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *Developmental Dynamics*, **225**: 592–596.
- Coloma LA, Ron S, Morales M y Almendáriz A. 2011. *Hyloxalus vertebralis*. IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Página de Internet: www.iucnredlist.org. Consultada 16-Enero-2011.
- del Pino EM, Venegas-Ferrín M, Romero-Carvajal A, Montenegro-Larrea P, Sáenz-Ponce N, Moya IM, Alarcón I, Sudou N, Yamamoto, S y Taira, M. 2007. A comparative analysis of frog early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**: 11882–11888.
- del Pino EM, Ávila M, Pérez O, Benítez M, Alarcón I, Noboa V y Moya IM. 2004. Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *The International Journal of Developmental Biology*, **48**: 663–670.
- Elinson RP y del Pino EM. 2012. Developmental diversity of amphibians. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, **1**: 345–369.
- Fan SY, De Sá RO y Radice GP. 2001. A Common Pattern of Somite Cell Rotation in Three Species of Pipidae. *Journal of Herpetology*, **35**: 114–116.
- Gatherer D y del Pino EM. 1992. Somitogenesis in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. *The International Journal of Developmental Biology*, **36**: 283–291.
- Gilbert S. 2003. *Developmental Biology*. Séptima Edición. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts. 771pp.
- Hamilton L. 1969. The formation of somites in *Xenopus*. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*, **22**: 253–264.
- Harrington MJ, Hong E y Brewster R. 2009. Comparative analysis of neurulation: first impressions do not count. *Molecular Reproduction and Development*, **76**: 954–965.
- Kiełbówna L. 1981. The formation of somites and early myotomal myogenesis in *Xenopus laevis*, *Bombina variegata* and

- Pelobates fuscus*. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*, **64**: 295–304.
- Krneta-Stankic V, Sabillo A y Domingo CR. 2010. Temporal and spatial patterning of axial myotome fibers in *Xenopus laevis*. *Developmental Dynamics*, **239**: 1162–1177.
- Mallo M, Vinagre T y Carapuço M. 2009. The road to the vertebral formula. *The International Journal of Developmental Biology*, **53**: 1469–1481.
- Michael P. 1981. A Normal Table of Early Development in *Bombina orientalis* (Boulenger), in Relation to Rearing Temperature. *Development, Growth & Differentiation*, **23**: 149–155.
- Moya IM. 2005. Somitogénesis en la rana *Colostethus machalilla* (Anura: Dendrobatidae). *Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas*, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Pierani A y Wassef M. 2009. Cerebral cortex development: From progenitors patterning to neocortical size during evolution. *Development, Growth & Differentiation*, **51**: 325–342.
- Pourquié, O. 2003. Vertebrate somitogenesis: a novel paradigm for animal segmentation? *The International Journal of Developmental Biology*, **47**: 597–603.
- Pourquié, O. 2001. Vertebrate Somatogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **17**: 311–350.
- Radice GP, Neff AW, Shim YH, Brustis JJ y Malacinski GM. 1989. Developmental histories in amphibian myogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, **33**: 325–343.
- Rafinska A. 1991. Reproductive biology of the fire-bellied toads, *Bombina bombina* and *B. variegata* (Anura: Discoglossidae): egg size, clutch size and larval period length differences. *Biological Journal of the Linnean Society*, **43**: 197–210.
- Sáenz-Ponce N, Mitgutsch C, del Pino EM. 2012. Variation in the schedules of somite and neural development in frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U. S. A*, **109**: 20503–20507.
- Smetanick MT, De Sá RO y Radice GP. 2000. Do timing and pattern of myogenesis correlate with life history mode in anurans. *Journal of Herpetology*, **34**: 637–642.
- Solís F, Ibáñez R, Jaramillo C, Chaves G, Savage J, Köhler G, Jungfer KH y Bolívar W. 2004. *Dendrobates auratus*. IUCN Red List of Threatened Species. Página de Internet: www.iucnredlist.org. Consultada 16-Enero-2011.
- Venegas-Ferrín M, Sudou N, Taira M y del Pino EM. 2010. Comparison of Lim1 expression in embryos of frogs with different modes of reproduction. *The International Journal of Developmental Biology*, **54**: 195–202.

- Wolpert L, Jessel T, Lawrence P, Meyerowitz E, Robertson E y Smith J. 2007. *Principles of Development*. Tercera Edición. Oxford University Press. USA. 551 pp.
- Youn BW y Malacinski GM. 1981. Comparative analysis of amphibian somite morphogenesis: cell rearrangement patterns during rosette formation and myoblast fusion. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*, **66**: 1–26.
- Youn BW, Keller RE y Malacinski GM. 1980. An atlas of notochord and somite morphogenesis in several anuran and urodelean amphibians. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*, **59**: 223–247.