

La gastrulación en ranas con diversos modos de reproducción

Eugenia M. del Pino¹

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

Recibido: 2010-04-12, aprobado: 2010-08-27

RESUMEN.- Las características de la gastrulación fueron analizadas en las siguientes ranas ecuatorianas *Gastrotheca riobambae*, *Colostethus* (= *Epipedobates*) *machalilla* y *Engystomops* (= *Physalaemus*) *randi* en comparación con *Xenopus laevis*, la rana que se estudia como organismo modelo del desarrollo embrionario. Se han encontrado profundas diferencias en el proceso de gastrulación en estas ranas. La comparación señala que en *C. machalilla* y *G. riobambae*, ranas con desarrollo lento, la convergencia y extensión dorsales (CED) es un proceso que ocurre después de la gastrulación mientras que en las de desarrollo rápido (*X. laevis*, y *E. randi*) la CED ocurre durante la gastrulación.

PALABRAS CLAVE: Gastrulación, *Colostethus*, *Epipedobates*, *Engystomops*, *Physalaemus*, *Gastrotheca*, *Xenopus*.

ABSTRACT.- The features of gastrulation were analyzed in the following frogs from Ecuador *Gastrotheca riobambae*, *Colostethus* (= *Epipedobates*) *machalilla*, and *Engystomops* (= *Physalaemus*) *randi* in comparison with *Xenopus laevis*, the model organism of frog development. There are major differences in the gastrulation process among these frogs. The comparison indicates that in *C. machalilla* and *G. riobambae*, frogs with slow development, dorsal convergence and extension (CED) occurs after gastrulation, whereas in frogs with rapid development (*X. laevis* and *E. randi*), CED occurs during gastrulation.

KEY WORDS: Gastrulation, *Colostethus*, *Epipedobates*, *Engystomops*, *Physalaemus*, *Gastrotheca*, *Xenopus*.

INTRODUCCIÓN

La Biología del Desarrollo analiza los mecanismos celulares y moleculares de la embriogénesis en unas pocas especies,

a las que se les conoce como los organismos modelo del desarrollo embrionario (1). Así, en muchos laboratorios del mundo se analiza a fondo el desarrollo de

la rana acuática *Xenopus laevis*, el organismo modelo de desarrollo para las ranas (1). El conocimiento del desarrollo de las especies modelo nos brinda un marco conceptual comparativo para el estudio de otras, cuya embriogénesis puede presentar modificaciones.

En nuestro laboratorio estudiamos el desarrollo embrionario de ranas con diversos modos reproductivos y lo comparamos con la embriogénesis de *X. laevis*, pues las variaciones de los fenómenos del desarrollo en diferentes especies corresponden a experimentos naturales, cuyo análisis permite un mejor entendimiento de la embriogénesis. Nuestro propósito es avanzar en la comprensión de los mecanismos del desarrollo embrionario y a la vez contribuir al mejor conocimiento de la naturaleza del Ecuador.

Para estudiar el desarrollo temprano se requiere mantener a las ranas en el laboratorio y por tal motivo solamente una pequeña parte de la gran biodiversidad de anfibios ecuatorianos ha podido analizarse desde el punto de vista del desarrollo embrionario. En nuestros estudios hemos tenido la importante colaboración del laboratorio de Herpetología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y de su proyecto "Balsa de los sapos", cuya meta es la reproducción en cautiverio de numerosas especies de ranas. Hemos estudiado el desarrollo de la rana túngara *Engys-*

tomops (= *Physalaemus*) *randi* Leiuperidae, de la rana dendrobátida *Colostethus* (= *Epipedobates*) *machalilla* y de la rana marsupial *Gastrotheca riobambae* Hemiphractidae, entre otras. En este trabajo se resumen los avances en la comprensión del desarrollo embrionario temprano de estas especies en comparación con la rana *X. laevis*.

Muchas ranas, como es el caso de *X. laevis*, depositan los gametos en el agua, la fecundación es externa y al cabo de 24 a 48 horas eclosionan larvas de vida libre, los renacuajos (2). Estas larvas crecen y durante la metamorfosis, el cuerpo se remodela. En la metamorfosis se reabsorben la cola y las branquias, y se desarrollan las extremidades para dar origen a una nueva rana. La rana juvenil requiere crecer y madurar sexualmente para convertirse en un adulto (1). Cabe señalar que la reproducción acuática es solamente una de las 29 maneras diferentes de reproducción que han sido detectadas en las ranas y que muchas especies de ranas que habitan en las regiones tropicales del mundo depositan sus huevos en ambientes terrestres (3). La humedad del bosque tropical ha permitido a las ranas experimentar con la reproducción y evolucionar modos reproductivos alejados del agua (3). Cabe resaltar que los huevos de las ranas carecen de mecanismos que impidan su desecación, y es por eso que la humedad ambiental de los bosques húmedos ha sido un factor

determinante para la evolución de muchos modos reproductivos en las ranas que viven en tales regiones.

Las ranas del género *Engystomops* protegen a sus huevos y embriones tempranos en nidos de espuma que flotan en los charcos temporales en los que estas ranas se reproducen (4, 5). El nido de espuma se construye a partir de la gelatina de huevo y durante el amplexus, o abrazo sexual, el macho bate con sus patas ese material gelatinoso para formar espuma en la cual los blancos huevos se camuflan y se mantienen suspendidos sobre el agua, evitando de esta manera la depredación de huevos y embriones. Al cabo de aproximadamente 2 días, ocurre la eclosión y los renacuajos caen al agua subyacente (6). Hemos analizado el desarrollo embrionario temprano de *E. pustulosus*, *E. coloradorum* y *E. randi* (6).

El desarrollo a partir de huevos terrestres ocurre en las ranas dendrobátidas, entre otras. En *C. machalilla*, los huevos son depositados en nidos terrestres que son protegidos por el macho hasta la eclosión de los renacuajos (7). En tal momento, el macho transporta a sus renacuajos sobre su espalda hasta el agua en donde se completa el desarrollo y los renacuajos alcanzan la metamorfosis (7). El desarrollo de *C. machalilla* en el nido terrestre dura 19 días y hemos podido analizar su desarrollo embrionario hasta la eclosión de los renacuajos (8).

El caso de la rana marsupial *G. riobambae*, Hemiphractidae, es más complejo debido a que los huevos son alojados en el cuerpo de la madre. Al momento del amplexus los embriones son depositados en una bolsa especializada de la madre (9). La hembra transporta a sus embriones en la bolsa materna por aproximadamente 4 meses, al cabo de los cuales nacen renacuajos avanzados, los que completan su desarrollo en el agua (9). Cabe señalarse que las crías nacen directamente como ranas en la mayoría de especies de ranas marsupiales. En tales casos se ha eliminado totalmente el desarrollo acuático.

Hemos analizado la biología reproductiva de la hembra y las características de los embriones de la rana marsupial *G. riobambae*. La bolsa materna es una especialización de la piel dorsal de la hembra y responde a una hormona similar a la progesterona, la hormona de la gestación, con la formación de cámaras vascularizadas para cada uno de los 120 embriones que por promedio se alojan en la bolsa materna (9). Por su parte, las branquias, que en los renacuajos de otras ranas corresponden a estructuras filamentosas que permiten el intercambio gaseoso en el agua, han sido modificadas notablemente. Las branquias de *G. riobambae* se denominan branquias acampanadas debido a su morfología, pues son dos discos que forman un saco altamente vascularizado alrededor de cada embrión. La circu-

lación sanguínea materna de las cámaras embrionarias de la bolsa materna y la circulación embrionaria, presente en las branquias acampanadas, se encuentran en estrecha cercanía. El tipo de intercambios que ocurren entre la madre y los embriones durante el largo período de incubación es en gran parte desconocido, pero la morfología sugiere una estrecha adaptación morfológica y fisiológica entre la madre y embriones para permitir la incubación en el cuerpo materno. Las adaptaciones morfológicas y fisiológicas para la incubación de embriones de la rana marsupial *G. riobambae* representan un modo paralelo al de los mamíferos para la reproducción terrestre (9). En este trabajo se revisan las modificaciones del desarrollo embrionario temprano de la rana marsupial *G. riobambae*, de la rana dendrobática *C. machalilla* y de la rana con nidos de espuma *E. randi* en comparación con *X. laevis*.

Tamaño del huevo y velocidad del desarrollo

Los huevos de la rana *X. laevis* tienen un hemisferio pigmentado de color oscuro, el denominado “hemisferio animal”; en tanto, el hemisferio opuesto, llamado “hemisferio vegetal”, tiene color claro. El huevo de *X. laevis* mide 1.2 mm de diámetro y en cada desove, la hembra deposita miles de huevos en el agua. Los renacuajos eclosionan al cabo de dos días desde la fecundación

(2). La velocidad del desarrollo de *X. laevis* es rápida en comparación con otras ranas.

Las ranas con nidos de espuma del género *Engystomops* presentan gran similitud con *X. laevis* en cuanto al tamaño del huevo y velocidad del desarrollo. Los huevos de *E. coloradorum* miden 1.2 mm de diámetro, como en *X. laevis*. En contraste, el huevo de *E. randi* mide solamente 0.9 mm de diámetro, lo que significa que el volumen del huevo de *X. laevis* y *E. coloradorum* es superior en 2.3 veces al del huevo de *E. randi*. Los huevos de *E. coloradorum* son uniformemente blancos a diferencia de *X. laevis*. Esta característica ha sido observada también en *E. randi*, *E. pustulosus* (6) y otras especies de *Engystomops* (trabajo en progreso). El color blanco tiene importancia para el camuflaje de los aproximadamente 120 huevos en el blanco nido de espuma de estas especies. Aún cuando los embriones de *Engystomops* son blancos, se encontró que no son albinos, pues tienen pigmento oscuro interno, que se distribuye alrededor de los núcleos (6). La velocidad del desarrollo de los huevos de *E. randi* y *E. coloradorum* en el nido de espuma es similar a lo observado en *X. laevis*, y al cabo de 2 días eclosionan los renacuajos. Es decir, la estrategia reproductiva de *Engystomops* consiste en la formación de nidos de espuma con pequeños huevos dotados de rápido desarrollo (6).

Los nidos terrestres de la rana dendrobátida *C. machalilla* contienen entre 8 a 16 huevos con pigmento oscuro en el hemisferio animal, como en *X. laevis* (8). El tamaño del huevo varía grandemente entre especies de dendrobátidos, así en *C. machalilla* el huevo mide 1.6 mm de diámetro, en *Epipedobates tricolor* 2 mm de diámetro, y en *Dendrobates auratus* el diámetro del huevo es de 3.5 mm de diámetro (10). La relación de volúmenes señala que el huevo de *C. machalilla* es 2.3 veces más grande que el huevo de *X. laevis*, en tanto que el volumen del huevo de *D. auratus* es 25 veces superior al de *X. laevis*. A pesar de las diferencias en el tamaño del huevo, el desarrollo embrionario de las ranas dendrobátidas es parecido entre sí en cuanto a su morfología y a que requieren de aproximadamente de 19 días desde la fecundación hasta la eclosión de renacuajos avanzados (8, 10).

Los embriones de la rana marsupial *G. riobambae* tienen una apariencia blanco amarillenta uniforme, miden 3 mm de diámetro y su volumen es aproximadamente 16-25 veces superior al del huevo de *X. laevis*. En otras especies de ranas marsupiales los huevos alcanzan hasta 10 mm o más de diámetro (11). El desarrollo embrionario protegido en el interior de la bolsa materna ocurre lentamente y alrededor de 100 renacuajos avanzados eclosionan después de 120 días de incubación (11).

El desarrollo que alcanza el renacuajo al tiempo de la eclosión es variable en las diferentes especies. Por tal motivo, consideramos que el tiempo requerido para que los embriones avancen desde la fecundación hasta la culminación del proceso de gastrulación brinda un mejor indicador de la velocidad del desarrollo. Los embriones de *X. laevis* requieren 14 horas para este proceso (2). Las 24 horas requeridas por los embriones de *E. coloradum* es un tiempo ligeramente superior a lo que necesitan los embriones de *X. laevis* para avanzar hasta el final de la gastrulación. (6). En cambio, los embriones de la rana dendrobátida *C. machalilla* requieren de 4 días (8) y los embriones de la rana marsupial *G. riobambae* toman 14 días para el mismo proceso (12). De acuerdo a estas diferencias consideramos que *X. laevis* y *E. coloradum* tienen desarrollo rápido, en tanto que la rana dendrobátida *C. machalilla* y la rana marsupial *G. riobambae* gozan de desarrollo lento. Cabe señalar que aunque el desarrollo embrionario de las ranas es influenciado por la temperatura, las diferencias temporales en la embriogénesis de las ranas de desarrollo lento y rápido son extremadamente grandes para que puedan homologarse solamente con cambios de la temperatura.

Patrones de gastrulación

La morfología de la gastrulación de *X. laevis* al igual que la de varias especies de ranas y urodelos ha sido ampliamente analizada debido a la facilidad de obtener embriones para estudio. Durante el proceso de la gastrulación en las ranas se forma una hendidura, el labio dorsal del blastoporo, en la región subecuatorial. El labio dorsal del blastoporo tiene la propiedad de duplicar los ejes al ser transplantado al lado ventral de otro embrión. Por tal motivo se le conoce como “el organizador”. Las características moleculares del organizador han sido ampliamente estudiadas y se han encontrado numerosos genes que se expresan en esta región del embrión y que tienen la propiedad de duplicar los ejes del embrión al ser expresados en el lado ventral (13). Uno de los genes del organizador es el gen *Lim1* (también conocido como *Lhx1*) (14).

Debido a que todas las ranas analizadas forman un labio dorsal del blastoporo, era de importancia determinar la expresión del gen *Lim1* en la gástrula temprana. Realizamos este análisis al nivel de proteína mediante inmunodetección en montaje entero con un anticuerpo contra la proteína *Lim1*. Determinamos que la proteína *Lim1* se expre-

sa en el labio dorsal del blastoporo de *X. laevis*, *E. randi*, *C. machalilla* y *G. riobambae* (15). Estos descubrimientos señalan que la expresión génica del organizador es altamente conservada. No se ha determinado si el trasplante del labio dorsal del blastoporo en la gástrula de diferentes ranas produciría duplicación de los ejes (15).

Una vez que se ha formado el labio del blastoporo, se profundiza y extiende lateral y ventralmente hasta formar un anillo alrededor del tapón de yema (Fig. 1). La formación del blastoporo obedece a movimientos morfogenéticos, entre los cuales cabe señalar el

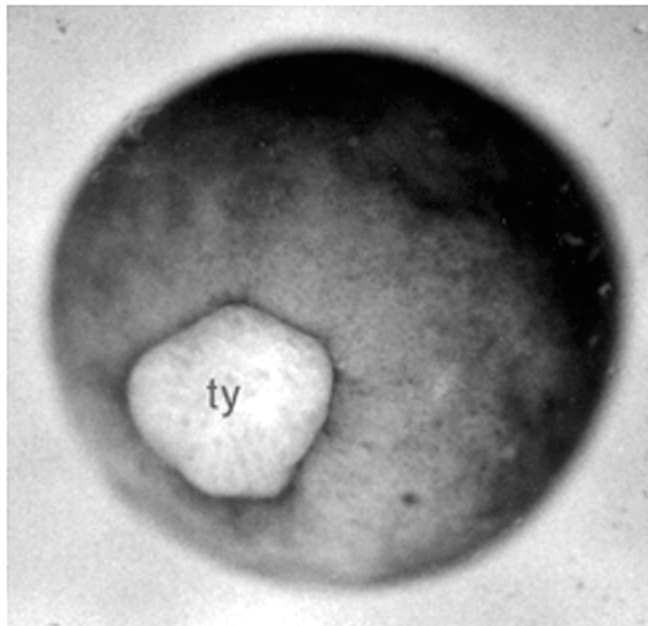


Figura 1. Apariencia externa de la gástrula media de *C. machalilla*. El blastoporo rodea al tapón de yema. Conforme avanza la gastrulación el tapón de yema se reduce hasta ser completamente internalizado cuando se cierra el blastoporo. Abreviatura: ty, tapón de yema.

proceso de involución que guía la internalización de las células superficiales, así como el proceso de CED que cambia la forma del embrión de la esférica del huevo a la alargada del renacuajo (16). Al completar la gastrulación se establece el plan del cuerpo con sus tres capas germinales: el ectodermo, el mesodermo y el endodermo tanto en las ranas, como en todos los vertebrados (1).

En nuestro trabajo nos hemos centrado en el estudio de la gastrulación por la importancia de este proceso y justamente para contribuir a su mejor entendimiento. Todas las ranas estudiadas (*X. laevis*, *E. randi*, *C. machalilla* y *G. riobambae*) forman un blastoporo alrededor de un tapón de yema (Fig. 1). En todos los casos, se forma un labio dorsal del blastoporo en la región sub ecuatorial del huevo. El mismo es morfológicamente visible al inicio de la gastrulación. Sin embargo hemos detectado sutiles diferencias respecto a la extensión del arquenterón y al inicio de la CED, como se señala a continuación.

Uno de los descubrimientos más significativos de nuestro trabajo fue determinar el modo de gastrulación de la rana marsupial *G. riobambae* (17). Los grandes huevos de esta rana forman un área de pequeñas células alrededor del blastoporo. Cuando al final de la gastrulación se retrae el tapón de yema y se cierra el blastoporo, se

forma un disco embriónico alrededor del blastoporo cerrado (Fig.2). El cuerpo del embrión se deriva de este pequeño disco de células (17). En el interior, debido a los movimientos de la gastrulación se forma una nueva cavidad, el arquenterón o intestino primitivo, la cual es muy pequeña y situada directamente por debajo del disco embriónico (Fig. 2). El desarrollo a partir de un disco embriónico es característico de las aves y no de las ranas y el modo de gastrulación de *G. riobambae* es el modo más divergente de gastrulación que se ha detectado en las ranas (17).

Al comparar los embriones de *G. riobambae* con los embriones de *X. laevis* detectamos que la extensión del arquenterón se había retardado en la gástrula de *G. riobambae* (17). Mientras en *X. laevis* el proceso de gastrulación y extensión del arquenterón ocurren simultáneamente, en los embriones de la rana marsupial *G. riobambae*, primero se completa el cerramiento del blastoporo y luego se inicia la extensión del arquenterón (Fig.2). De modo similar a *X. laevis*, los embriones de rápido desarrollo de la rana con nidos de espuma, *E. randi*, expanden el arquenterón durante la gastrulación, en tanto que la rana dendrobátida, *C. machalilla*, cuyo desarrollo es lento, sigue un patrón similar al de *G. riobambae* con un retardo en la extensión del arquenterón.

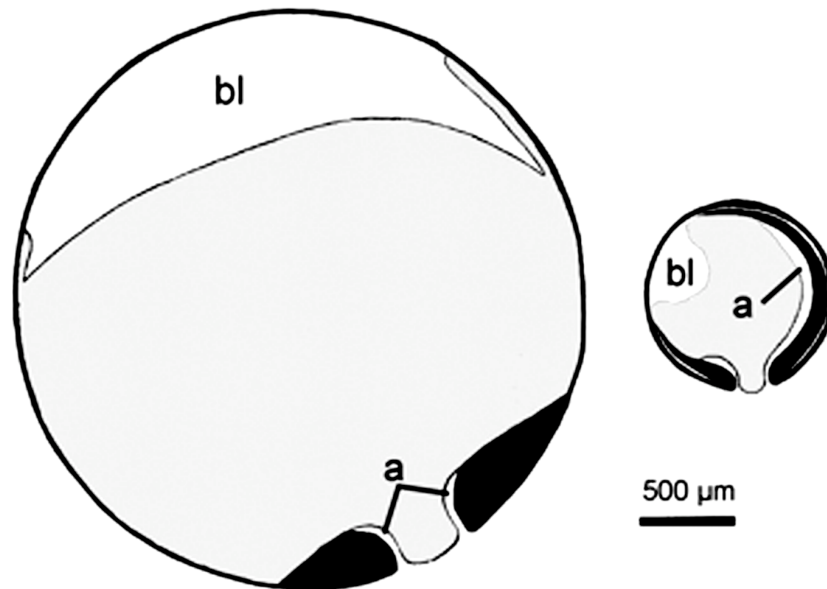


Figura 2. Esquemas de secciones sagitales de la gástrula media de *G. riobambae* y *X. laevis*. En *G. riobambae* el arquenterón se forma durante la gastrulación y se expande después del cerramiento del blastoporo. En cambio, en *X. laevis* la extensión del arquenterón está solapada con el proceso de gastrulación. Los dibujos están realizados a escala. Imagen modificada de la referencia (9). Abreviaturas: a, arquenterón; bl, blastocele.

Varios movimientos morfogenéticos contribuyen a la formación y extensión del arquenterón, entre ellos la CED juega un importante papel. Los movimientos de CED se inician en la gástrula media de *X. laevis* y son responsables de concentrar a las células hacia el lado dorsal, mientras al mismo tiempo el embrión se alarga en sentido antero-posterior (18, 19). La CED permite el cambio de forma del embrión de la forma esférica del huevo a la alargada del renacuajo. Como resultado de proceso de CED, se forma el notocordio en la línea media dorsal del embrión de *X. laevis* (18, 19). La expresión del gen *Brachyury (Bra)* en el notocordio temprano es

evidencia molecular de que se han iniciado los movimientos de CED (20).

Mediante inmuno-detección en montaje entero para la proteína Bra hemos determinado el inicio del alargamiento del notocordio, es decir el inicio de la CED en los embriones de diferentes ranas (12, 21, 22). Los resultados señalan importante variabilidad. En las ranas con desarrollo rápido, *X. laevis*, y en la rana con nidos de espuma, *E. randi*, el alargamiento del notocordio se inicia en la gástrula media (Fig. 3). En tanto en las ranas con desarrollo lento, *C. machalilla* y *G. riobambae*, el inicio de la extensión del notocordio se ha retardado hasta completar la gastrulación (Fig. 3).

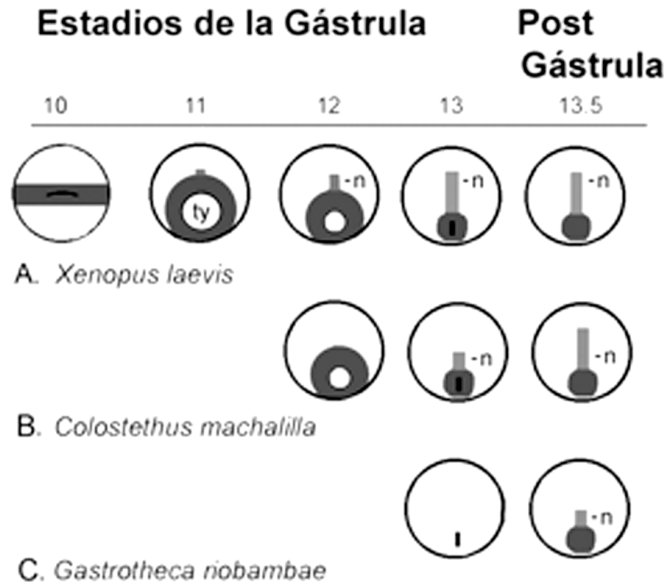


Figura 3. Comparación de la expresión de Bra en la gástrula de (A) *X. laevis*, (B) *C. machalilla* y (C) *G. riobambae*. La expresión de Bra se representa en color negro. Se muestra la expresión de Bra en células profundas del mesodermo prospectivo, que aparece como un anillo alrededor del tapón de yema y en el notocordio en *X. laevis* (24). La extensión del notocordio se inicia durante la gastrulación en *X. laevis* (24) y está retrasada hasta el cerramiento del notocordio en *G. riobambae* y *C. machalilla* (12, 21). Imagen modificada de la referencia (25). Abreviaturas: n, notocordio; ty, tapón de yema.

Cabe preguntarse sobre el significado de las diferencias encontradas: en primer lugar la comparación señala que los movimientos de CED no son intrínsecos a la gastrulación. La CED es un módulo del desarrollo que se encuentra solapado con la gastrulación en ranas de desarrollo rápido (10, 22). Los embriones de *X. laevis*, que experimentalmente tienen defectos en el gen *dishevelled* (*dsh*), cierran el blastoporo en ausencia de alargamiento del notocordio y del cuerpo (23). El gen *dsh* es parte de la ruta metabólica de la polaridad celular plana que es responsable de

la CED y los embriones defectuosos para *dsh* brindan una evidencia experimental de la modularidad de los procesos de desarrollo embrionario (23).

INTERPRETACIÓN Y CONCLUSIONES

Debido a que la CED alarga el cuerpo del embrión, cabe suponer que en especies con desarrollo acuático el rápido alargamiento del cuerpo es una necesidad para el desarrollo del renacuajo, dicha larva puede nadar y así ocultarse de los predadores. En tanto que en aquellas ranas que tienen repro-

ducción más lenta, no existe esa presión de un rápido alargamiento del cuerpo debido a sus adaptaciones terrestres, y la CED ha sido retrasada hasta completar la gastrulación.

Nuestros resultados señalan que la tarea importante que se realiza durante la gastrulación es la internalización de las células para formar las tres capas germinales. El alargamiento del cuerpo es otro proceso que puede o no estar solapado con la gastrulación. La comparación del desarrollo temprano de diversas ranas nos ha permitido alcanzar esta conclusión.

Desde el punto de vista del mejor conocimiento de las especies ecuatorianas, es de resaltar que las adaptaciones terrestres en las ranas dendrobatidas (Dendrobatidae) y de la rana marsupial *G. riobambae* (Hemiphraetidae) van asociadas con lento desarrollo, en tanto que el desarrollo sobre el agua en los nidos de espuma de las ranas túngara (Leuiperidae) es acelerado, al igual que en el organismo modelo del desarrollo, la rana *X. laevis*.

AGRADECIMIENTOS

Se expresan sinceros agradecimientos a todos los estudiantes y colaboradores del laboratorio de Biología del Desarrollo de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) por su apoyo a lo largo de muchos años. Sus aportes han permitido alcanzar esta síntesis. En particular se agradece a la Lic. N. Sáenz Ponce por sus comentarios

críticos. Se reconoce con gratitud la donación de embriones de diferentes ranas realizada por los Drs. L. Coloma, S. Ron, D. Almeida Reinoso, otros miembros del laboratorio de Herpetología de la PUCE y de su proyecto "Balsa de los sapos". Este trabajo se benefició de las becas de investigación de la PUCE 2008 y 2009 y de becas de investigación anteriores de la PUCE. Se agradece la beca de investigación otorgada por la Academia de Ciencias para el Mundo en Desarrollo, TWAS 07-017 LDC/BIO/LA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wolpert, L.; Jessell, T.; Lawrence, P.; Meyerowitz, E.; Roberson, E. & Smith, J. 2007. Principles of development. Tercera Edición. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
2. Nieuwkoop, P.D. & Faber, J. 1994. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin), Garland Publishing, New York.
3. Duellman W. E. & Trueb L. 1986. Biology of Amphibians. McGraw-Hill, New York.
4. Davidson E. H. & Hough B. R. 1969. Synchronous oogenesis in *Engystomops pustulosus*, a neotropical anuran suitable for laboratory studies: localization in the embryo of RNA synthesized at the lampbrush stage. Journal of Experimental Zoology 172: 25-48.

5. Ryan M. J. 1985. The Túngara Frog: A Study in Sexual Selection and Communication. Chicago: The University of Chicago Press. Chicago.
6. Romero-Carvajal A.; Sáenz-Ponce N.; Venegas-Ferrín M.; Almeida-Reinoso D.; Lee C.; Bond J.; Ryan M. J.; Wallingford J. B. & del Pino, E.M. 2009. Embryogenesis and Laboratory Maintenance of the Foam-Nesting Túngara Frogs, Genus *Engystomops* (= *Physalasmus*). *Developmental Dynamics* 238: 1444–1454.
7. Coloma, L. A. 1995. Ecuadorian frogs of the genus *C. machalilla* (Anura: Dendrobatidae). *Miscellaneous Publication Natural History Museum. University of Kansas, Lawrence* 87: 1-74.
8. del Pino, E. M.; Ávila, M. E.; Pérez, O. D.; Benítez, M. S.; Alarcón, I.; Noboa, V. & Moya, I. M. 2004. Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *International Journal of Developmental Biology*. 48: 663-670.
9. del Pino, E. M. 1989. Modifications of oogenesis and Development in Marsupial frogs. *Development* 107: 169-187.
10. del Pino, E. M.; Venegas-Ferrín, M.; Romero-Carvajal A.; Montenegro-Larrea P.; Sáenz-Ponce N.; Moya I. M.; Alarcón I.; Sudou N.; Yamamoto S. & Taira, M. 2007. A comparative analysis of frog early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U. S. A.* 104: 11882-11888.
12. del Pino E. M. & Escobar B. 1981. Embryonic stages of *Gastrotheca riobambae* (Fowler) during maternal incubation and comparison of development with that of other eggbrooding hylid frogs. *Journal of Morphology* 167: 277-295.
12. del Pino, E. M. 1996. The expression of *Brachyury (T)* during gastrulation in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. *Developmental Biology* 177: 64–72.
13. De Robertis, E.M. 2006. Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos. *Nature Reviews Molecular and Cell Biology* 7: 296–302.
14. Taira, M.; Otani, H.; Saint-Jeannet, J.P. & Dawid, I.B. 1994. Role of the LIM class homeodomain protein *Xlim-1* in neural and muscle induction by the Spemann organizer in *Xenopus*. *Nature* 372: 677-679.
15. Venegas-Ferrín, M.; Sudou, N.; Taira, M. & del Pino, E.M. 2010. Comparison of *Lim1* expression in embryos of frogs with different modes of reproduction. *International Journal Developmental Biology* 54: 195-202.
16. Keller, R. & Shook, D. 2004. Gastrulation in amphibians. En: Stern, C.D. ed. *Gastrulation from Cells to*

- Embryo. 171-203. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
17. del Pino E. M. & Elinson R. P. 1983. Gastrulation produces an embryonic disc, a novel developmental pattern for frogs. *Nature* 306: 589-591.
 18. Keller, R. 1975. Vital dye mapping of the gastrula and neurula of *Xenopus laevis*. I. Prospective areas and morphogenetic movements of the superficial layer. *Developmental Biology* 42: 222-241.
 19. Keller, R. 1976. Vital dye mapping of the gastrula and neurula of *Xenopus laevis*. II. Prospective areas and morphogenetic movements of the deep layer. *Developmental Biology* 51: 118-137.
 20. Winklbauer, R. 1990. Mesodermal cell migration during *Xenopus* gastrulation. *Developmental Biology* 142: 155-168.
 21. Benítez, M.-S. & del Pino, E. M. 2002. The expression of Brachyury during development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *Developmental Dynamics* 225: 592-596.
 22. Moya, I. M.; Alarcón, I. & del Pino, E. M. 2007. Gastrulation of *Gastrotheca riobambae* in comparison with other frogs. *Developmental Biology* 304: 467-478.
 23. Ewald, A.J.; Peyrot, S.M.; Tyszk, J.M.; Fraser, S.E. & Wallingford J.B. 2004. Regional requirements for *Dishevelled* signaling during *Xenopus* gastrulation: separable effects on blastopore closure, mesendoderm internalization and archenteron formation. *Development* 131: 6195-6209.
 24. Smith, J. C.; Price, B. M. J. ; Green, J. B.A.; Weigel, D. & Herrmann, B.G. 1991. Expression of a *Xenopus* homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell* 67: 79-87.
 25. Benítez, M. S. & del Pino, E. M. 2003. La expresión de Brachyury en ranas con modos divergentes de desarrollo. *Revista de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador* 71: 7-14.