

La placa del techo del gastrocele de *Epipedobates tricolor* (Anura: Dendrobatidae)

Natalia Sáenz Ponce, Michelle Arias Contreras 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: 04, 05, 2012; aceptado: 09, 10, 2012

RESUMEN.- En la mayoría de los vertebrados usados como modelo del desarrollo, la determinación de la asimetría izquierda-derecha de la localización de órganos tales como el corazón se determina en la neurula y obedece a un flujo de fluido hacia el lado izquierdo. El flujo de fluido está guiado por el movimiento sincronizado de cilios en el techo del gastrocele, que corresponde a la cara interna del techo de la neurula de los anuros. Se estudió la morfología de la neurula y la placa del techo del gastrocele del anuro ecuatoriano, *Epipedobates tricolor* (Dendrobatidae). La placa del techo del gastrocele de la neurula de *E. tricolor* reviste dorsalmente a la cavidad del gastrocele y consiste de un epitelio monociliado, como en *Xenopus laevis* y otras ranas. La longitud de los cilios de *E. tricolor* fue de 8 μm en promedio. La placa del techo del gastrocele de *E. tricolor* comparte las características morfológicas observadas en la rana dendrobátida, *Epipedobates machalilla* y otras ranas con diversos modos reproductivos. La comparación sugiere que *E. tricolor* mantiene el mecanismo de flujo de fluido guiado por cilios para la determinación de la asimetría izquierda-derecha, como en otros anuros.

PALABRAS CLAVE: Asimetría izquierda-derecha, cilios, nodo, placa del techo del gastrocele, vesícula de Kupffer.

ABSTRACT.- In most model vertebrates, the left-right asymmetry in the location of organs, such as the heart, is determined in the neurula, and derives from fluid flow towards the left side. The fluid flow results from synchronized movement of cilia in the gastrocoel roof plate, which is the inner side of the dorsal roof of the anuran neurula. The morphology of the neurula and of the gastrocoel roof plate was analyzed in the Ecuadorian anuran, *Epipedobates tricolor* (Dendrobatidae). The gastrocoel roof plate coats the gastrocoel cavity in the dorsal side in the *E. tricolor* neurula, and consists of a mono-ciliated epithelium, as in *Xenopus laevis* and other frogs. The cilia of the *E. tricolor* gastrocoel roof plate had a mean length of 8 μm . The gastrocoel roof plate of *E. tricolor* shares similar morphological characteristics with the dendrobatid frog *Epipedobates machalilla* and with other frogs that display various modes of reproduction. The comparison suggests that fluid flow guided by cilia of the gastrocoel roof plate likely determines the left-right asymmetry in *E. tricolor* as in other anurans.

KEYWORDS: Cilia, gastrocoel roof plate, Kupffer's vesicle, left-right asymmetry, node.

INTRODUCCIÓN

Existen importantes asimetrías del eje izquierdo-derecho en el cuerpo humano como son la localización asimétrica del corazón, del lóbulo principal del hígado, del bazo y la vesícula biliar. Mutaciones en el ratón han demostrado que hay dos niveles de regulación del eje izquierdo-derecho: un nivel general y otro para cada uno de los órganos. Las mutaciones del gen *situs inversus viscerum (iv)* resulta en la determinación aleatoria e independiente del eje izquierdo-derecho para cada órgano. La falta de coordinación resultante produce trastornos, que pueden ser fatales, debido a que existen errores en la conexión de los principales vasos sanguíneos. Por el contrario, los ratones son normales cuando se da la inversión de todos los órganos como imagen en el espejo. La inversión de órganos también ha sido detectada en los humanos. La asimetría izquierda-derecha de los órganos del cuerpo tiene como base la expresión asimétrica de genes durante el desarrollo embrionario. El punto determinante de la cascada de expresión génica, que genera la asimetría izquierda-derecha tanto en los mamíferos como en otros vertebrados, es la expresión de las proteínas Nodal en el lado izquierdo de la placa lateral del mesodermo (revisado por Vandenberg y Levin, 2012; Gilbert, 2010; Blum *et al.*, 2009; Tian y Meng, 2006).

Todas las células tienen una asimétrica disposición de las organelas (Hausen y Riebesell, 1991). Dicha asimetría en el huevo fecundado se considera la base de la asimetría izquierda-derecha de los vertebrados (Schweickert *et al.*, 2012; Vandenberg y Levin, 2012). Por otro lado, se ha encontrado una estructura de la neurula que influye directamente en la asimetría izquierda-derecha. Esta estructura se deriva del mesodermo presuntivo superficial de la gástrula temprana, y en la neurula reviste la cara interna del notocordio posterior. En los mamíferos esta estructura se conoce como el “nodo” o “notocordio posterior”, en los peces se denomina como “la vesícula de Kupffer”, en tanto que en el anuro *Xenopus laevis* esta estructura

es la “placa del techo del gastrocele”. (Blum *et al.*, 2009; 2007; Shook *et al.*, 2004). La coordinación entre los eventos tempranos de la determinación de la asimetría izquierda-derecha con los eventos tardíos, que ocurren después de la gastrulación, es desconocida (Schweickert *et al.*, 2012; Vandenberg y Levin, 2012).

El nodo, la vesícula de Kupffer y la placa del techo del gastrocele son estructuras homólogas y transitorias que están caracterizadas por derivarse del mesodermo y estar recubiertas de un epitelio mono-ciliado (Blum *et al.*, 2009). Cada célula epitelial expresa polaridad planar manifestada por la presencia de un único cilio localizado en la región apical posterior (Antic *et al.*, 2010; Blum *et al.*, 2009). Los cilios tienen una longitud aproximada de 5 μm en el pez cebra, el ratón y la rana *X. laevis*, y la rotación coordinada de los cilios en el sentido de las agujas del reloj genera un flujo de fluido hacia el lado izquierdo (Blum *et al.*, 2009). El flujo de fluido gatilla la expresión diferencial de genes en los lados izquierdo y derecho, lo que gatilla la formación asimétrica de órganos y tejidos (Tian y Meng, 2006).

En *X. laevis* se ha investigado la regulación génica de la asimetría izquierda-derecha. El movimiento coordinado de los cilios de la placa del techo del gastrocele produce un flujo de fluido hacia el lado izquierdo, el mismo que gatilla la expresión asimétrica del gen *Nodal* en el lado izquierdo de la neurula de la siguiente manera: El inhibidor de *Nodal* denominado *Coco* originalmente se expresa a ambos lados de la placa del techo del gastrocele. Como resultado del flujo de fluido, la expresión de *Coco* se reprime en el lado izquierdo permitiendo de esta manera la expresión de *Nodal* exclusivamente en ese lado. En cambio, en el lado derecho la continuada expresión de *Coco* reprime la expresión de *Nodal* y de esta manera se regula la expresión de *Nodal* de modo exclusivo en el lado izquierdo de la placa lateral del mesodermo. El inhibidor *Coco* es un miembro de la familia Cerberus-Dan de proteínas secretadas inhibitorias y es homólogo al

gen del ratón *cerberus-like-2* (Schweickert *et al.*, 2010). La cascada que gatilla la expresión de *Nodal* y la asimetría izquierda-derecha se alteran al interferir en el desarrollo de los cilios o al inhibir el flujo de fluido (Hatayama *et al.*, 2011; Schweickert *et al.*, 2010; Vick *et al.*, 2009). La generación de la asimetría izquierda-derecha del pollo difiere de la de otros vertebrados por cuanto sus embriones carecen de mesodermo presuntivo superficial y de células mono-ciliadas en el epitelio que reviste el techo de su arquenterón (Blum *et al.*, 2009; Schlueter y Brand, 2007; Shook *et al.*, 2004). Se denomina gastrocele a la cavidad formada durante la gastrulación que no está plenamente revestida de endodermo y que tiene mesodermo expuesto en la superficie de su techo. El arquenterón es la cavidad formada durante la gastrulación que se encuentra completamente revestida de endodermo (Shook *et al.*, 2004).

En las neurulas de las ranas *Ceratophrys stolzmanni*, *Engystomops randi*, *Epipedobates machalilla* y *Gastrotheca riobambae* se determinó que la placa del techo del gastrocele consiste de epitelio mono-ciliado, evidencia que sugiere un patrón conservado que debe incluir flujo de fluido gatillado por el movimiento de los cilios para el establecimiento de la asimetría izquierda-derecha en estas ranas (Sáenz-Ponce *et al.*, 2012). Las ranas analizadas difieren en su velocidad del desarrollo y modos de gastrulación (Sáenz-Ponce *et al.*, 2012). Como complemento a los estudios previos (Sáenz-Ponce *et al.*, 2012), se procedió a analizar la presencia de células monociliadas en la placa del techo del gastrocele de la neurula de *Epipedobates tricolor* Boulenger, 1899 (Dendrobatidae). Esta especie está distribuida en la Provincia de Bolívar, Ecuador a una elevación entre los 1.000 a 1.769 m (AmphibiaWeb, 2012). La gástrula de *E. tricolor* está caracterizada por la formación de un prominente collar circumblastoporal y retardo en el alargamiento del gastrocele, un patrón similar al encontrado en *Epipedobates machalilla* y otros dendrobátidos (del Pino *et al.*, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las neurulas de *Epipedobates tricolor* utilizadas en este estudio se obtuvieron de la donación de posturas por parte de la División de Anfibios del Museo de Zoología de la PUCE y su programa de mantenimiento en cautiverio de ranas, "Balsa de los sapos". La localidad de colección de las ranas es Moraspungo, Provincia de Bolívar, Ecuador.

Los embriones fueron mantenidos en cámaras húmedas a temperatura ambiente del laboratorio que fluctuó entre 18 a 21° C. La determinación de los estadios del desarrollo así como el cultivo y procesamiento de los embriones fue de acuerdo a lo descrito para *E. machalilla* (del Pino *et al.*, 2004). Para analizar la morfología externa de la neurula, los embriones fueron fijados en el fijativo de Smith (Moya *et al.*, 2007). Se analizó tanto la morfología externa de la neurula así como las características del techo del gastrocele para cada embrión. El lado dorsal de los embriones de estadios 13 a 16 fue bisectado para el análisis del techo del gastrocele.

Los cilios del techo del gastrocele fueron detectados mediante inmuno-localización en montaje entero. Los embriones fueron fijados en el fijativo de memfa por tres horas (Harland, 1991). Los embriones se incubaron en una dilución 1:700 con un anticuerpo monoclonal producido en ratón contra la tubulina acetilada. El anticuerpo secundario fue anti-ratón, producido en conejo, conjugado-Cy3 (los dos anticuerpos se adquirieron de la compañía Sigma, St. Louis, Mo, Estados Unidos). La dilución utilizada fue de 1:250 (Vick *et al.*, 2009). Para la detección de cilios se montó el techo del gastrocele en placas portaobjeto con glicerina y fueron cubiertas con laminillas cubreobjeto. Se analizaron los embriones con un microscopio de disección Stemi SV6 de Carl Zeiss. Las imágenes de fluorescencia de los cilios fueron obtenidas con un microscopio invertido AxioObserver.Z1 de Carl Zeiss. Ambos microscopios están acoplados al programa Axiovision (Carl Zeiss, Overkochen, Alemania) que permitió la digitalización y microfotografía de las imágenes.

RESULTADOS

La neurula y la placa del techo del gastrocele de *Epipedobates tricolor*.- Se analizó la morfología externa de la neurula de *E. tricolor* de aquellos embriones que luego fueron disectados para el estudio de la placa del techo del gastrocele. Las características del desarrollo de *E. machalilla* (del Pino *et al.*, 2004) brindaron los parámetros de comparación. Los huevos de *E. tricolor* son de tamaño superior a los de *E. machalilla* (Tabla 1) y se caracterizan por mayor pigmentación oscura en el hemisferio animal (del Pino *et al.*, 2007). El pigmento oscuro permitió la clara detección de la placa neural en embriones de estadio 13 de *E. tricolor* (Fig. 1A). En el estadio 14 se observó que los pliegues neurales se encontraban elevados (Fig. 1B). En embriones más avanzados, del estadio 15 se observó que los pliegues neurales estaban en contacto en la parte caudal del embrión, en tanto que en la parte rostral, los pliegues neurales aún se mantenían separados (Fig. 1C). Estas características morfológicas de la neurula de *E. tricolor* son similares a las características de la neurula de *E. machalilla* (del Pino *et al.*, 2004).

Se procedió a bisectar la región de la placa neural de embriones de estadio 13 (Fig. 1A) y la región de los pliegues neurales de embriones de estadios 14, 15 y 16 (Fig. 1B, C) para analizar la morfología de la placa del techo del gastrocele. Para el efecto, se montaron las bisecciones en una placa portaobjeto y se procedió a observar la cara interna, que revistió al gastrocele y que correspondió al techo del gastrocele (Fig. 2A). Se detectó un área pigmentada de forma triangular, rostral al blastoporo cerrado y al gran collar circumblastoporal. Esta región se localiza en la cara interna del techo del gastrocele en embriones de estadios 14 al 17 (Fig. 2A). El área pigmentada estuvo delimitada lateralmente, a ambos lados, por regiones libres de pigmento que se considera corresponden a las crestas endodermales laterales (Fig. 2A). La estruc-

tura pigmentada corresponde a la placa del techo del gastrocele y tiene una morfología similar a la observada en *E. machalilla* y *Ceratophrys stolzmanni* (Santillana Ortiz y del Pino, 2009; Sáenz-Ponce *et al.*, 2012). De modo similar, la disposición de las crestas endodermales laterales que bordean a la placa del techo del gastrocele fue similar a lo observado en otras especies. En *X. laevis* se ha demostrado que con el avance del desarrollo embrionario, las crestas endodermales laterales se juntan en la línea media dorsal. Finalmente recubren totalmente con endodermo a la cavidad, que pasa a denominarse arquenterón (Blum *et al.*, 2009).

En los embriones de *E. tricolor*, no se realizaron secciones histológicas de la placa del techo del gastrocele, pero se procedió a analizar la presencia de un epitelio monociliado en esta estructura. En embriones de estadios 14 a 16, se detectó que el epitelio que reviste el techo del gastrocele consiste de células monociliadas (Fig. 2B). Los cilios tuvieron una longitud promedio de 8 μm (Fig. 2B). No se detectaron cilios en embriones del estadio 13. Estas observaciones están acordes con las características de la placa del techo del gastrocele en *E. machalilla* (Sáenz-Ponce *et al.*, 2012).

El tamaño de los cilios de la placa del techo del gastrocele varía entre especies. Los cilios de mayor tamaño ocurrieron en las dos especies de dendrobátidos, *E. machalilla* y *E. tricolor*, en comparación con otras especies analizadas (Tabla 1) (Sáenz-Ponce *et al.*, 2012; Blum *et al.*, 2009). Cabe resaltar que los cilios de la placa del techo del gastrocele de *E. tricolor* fueron los más grandes (Tabla 1). No se encontró relación entre el tamaño del huevo, modo reproductivo y velocidad del desarrollo con el tamaño de los cilios de la placa de techo del gastrocele (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación del desarrollo embrionario de *E. tricolor* con otras ranas

Especie	Modo reproductivo	Diámetro del huevo (mm)	Tiempo del desarrollo ^a	Longitud de los cilios ^b (µm)	Referencias ^c
Desarrollo rápido					
<i>Xenopus laevis</i>	Acuático	1.2	14 horas	5	1,2
<i>Ceratophrys stolzmanni</i>	Acuático	2.2	10 horas	7	1,3
<i>Engystomops randi</i>	Nido de espuma	1.1	24 horas	4	1,3
Desarrollo lento					
<i>Epipedobates machalilla</i>	Nido terrestre	1.6	4 días	6	1,3
<i>Epipedobates tricolor</i>	Nido terrestre	2.0	4 días	8	1
<i>Gastrotheca riobambae</i>	Bolsa materna	3.0	14 días	4	1,3

^a Tiempo desde la fecundación hasta el final de la gastrulación de acuerdo a del Pino *et al.* (2007).

^b Longitud de los cilios de la placa del techo del gastrocele.

^c Referencias: 1, del Pino *et al.*, 2007; 2, Blum *et al.*, 2009; 3, Sáenz-Ponce *et al.*, 2012.

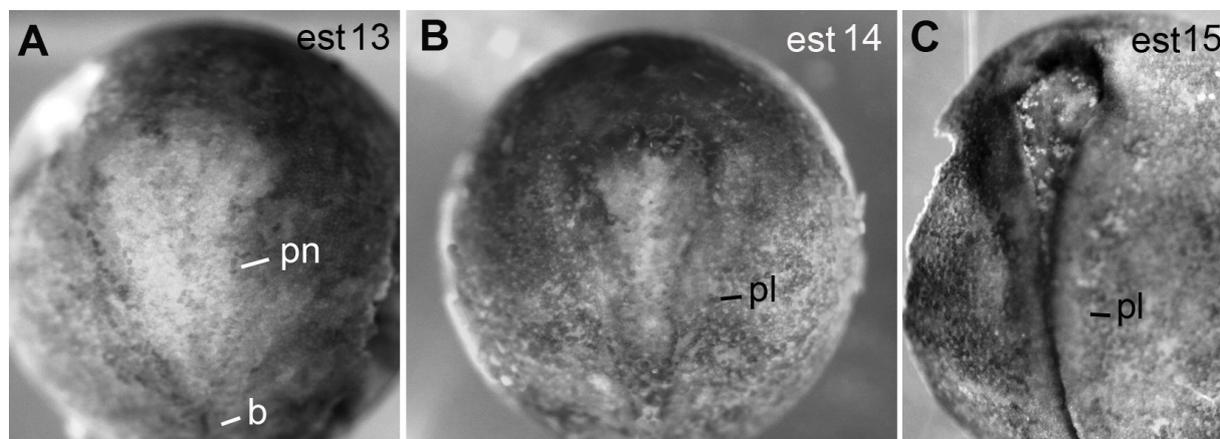


Figura 1. Vista externa de la neurula de *E. tricolor*. Los embriones están orientados con la región rostral hacia arriba. (A) Estadio avanzado de blastoporo en forma de hendidura, que muestra la formación de la placa neural. (B) Neurula temprana. Se distinguen los pliegues neurales elevados. (C) Neurula media. Los pliegues neurales se encuentran paralelos en la región media y caudal. Abreviaturas: b, blastoporo; est, estadio; pn, placa neural; pl, pliegue neurales. Los estadios del desarrollo en esta y las siguientes figuras fueron determinados de acuerdo a del Pino *et al.*, 2004 y Nieuwkoop y Faber, 1994.

DISCUSIÓN

Modos de gastrulación y la placa del techo del gastrocele.- Existen importantes diferencias en el modo de gastrulación de *X. laevis* (Pipidae) y *Engystomops randi* (Leiuperidae), especies con desarrollo rápido, en com-

paración con las especies de desarrollo lento *E. machalilla*, *E. tricolor* (Dendrobatidae), y *G. riobambae* (Hemiphractidae) (del Pino, 2010; del Pino *et al.*, 2007; Moya *et al.*, 2007). En particular el alargamiento del notocordio ocurre después del cerramiento del blastopo-

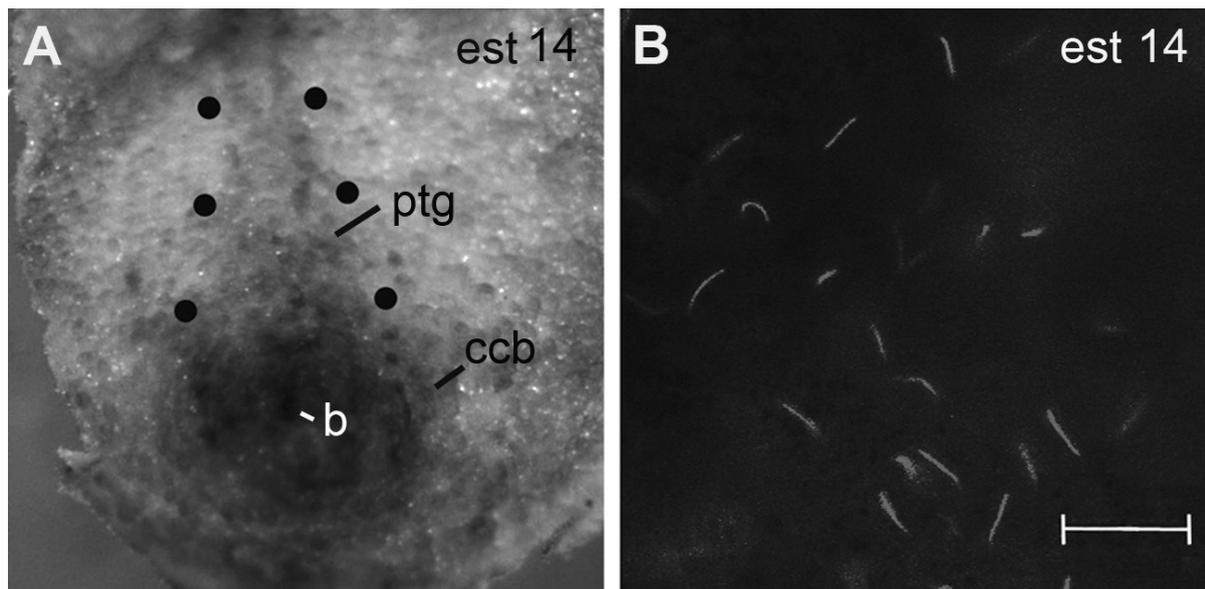


Figura 2. La placa del techo del gastrocele en la neurula de *E. tricolor*. (A) Vista en montaje entero de la placa del techo del gastrocele. La vista externa de este embrión fue similar al embrión que se muestra en la Fig. 1B. Con puntos oscuros se señalan los bordes de las crestas endodermales laterales. La placa del techo del gastrocele tiene pigmentación oscura. El embrión está orientado con la región dorsal hacia arriba. (B) Campo de cilios de la placa del techo del gastrocele detectados por inmuno-localización y fluorescencia indirecta en una neurula temprana, similar a la que se muestra en la Fig. 1B. Los cilios miden 8 μm , en promedio. La barra corresponde a 100 μm (A) y 20 μm (B). Abreviaturas: b, blastoporo; est, estadio; ccb, collar circumblastoporal; ptg, placa del techo del gastrocele.

ro en las especies de desarrollo lento. Por tal motivo era de particular interés determinar el inicio de la formación de la placa del techo del gastrocele y la presencia de cilios en esta estructura en especies con diversos modos reproductivos y velocidades del desarrollo (Sáenz-Ponce *et al.*, 2012). El análisis ha permitido sugerir que, como en *X. laevis*, las especies analizadas tienen mesodermo presuntivo superficial en la zona ecuatorial de la gástrula temprana de estadio 10.5 (Fig. 3), el mismo que es internalizado por los movimientos de la gastrulación. En las ranas con desarrollo rápido, el mesodermo presuntivo dorsal reviste el techo del gastrocele durante la gastrulación en tanto que en aquéllas de desarrollo lento, el mesodermo presuntivo se almacena en la superficie del gran collar circumblastoporal que se forma durante la gastrulación. Una vez que se inicia el alargamiento del notocordio y del embrión, debido a la convergencia y extensión dorsales (estadio 13), se alarga el gastrocele y

el mesodermo dorsal reviste el techo de esta cavidad (estadio 14), al igual que en las especies de desarrollo rápido (Fig. 3). Aun cuando no se ha realizado el mapeo del mesodermo, se propone que la placa del techo del gastrocele, con un origen en el mesodermo presuntivo superficial de la gástrula temprana, es un aspecto conservado del desarrollo de ranas que pertenecen a cuatro familias diferentes y que tienen diferentes modos de gastrulación (Tabla 1).

Comparación de la placa del techo del gastrocele de *E. tricolor* con otras especies.-

La neurula de *E. tricolor* tiene un epitelio ciliado en el techo del gastrocele como en otras ranas (Sáenz-Ponce *et al.*, 2012; Blum *et al.*, 2009). Este estudio añade datos al análisis de Sáenz-Ponce *et al.*, 2012 y señalan que la presencia de epitelio mono-ciliado ocurre en un dendrobátido cuyos huevos son de mayor tamaño que los de *E. machalilla* (Tabla 1). La presencia de un techo del gastrocele ciliado en

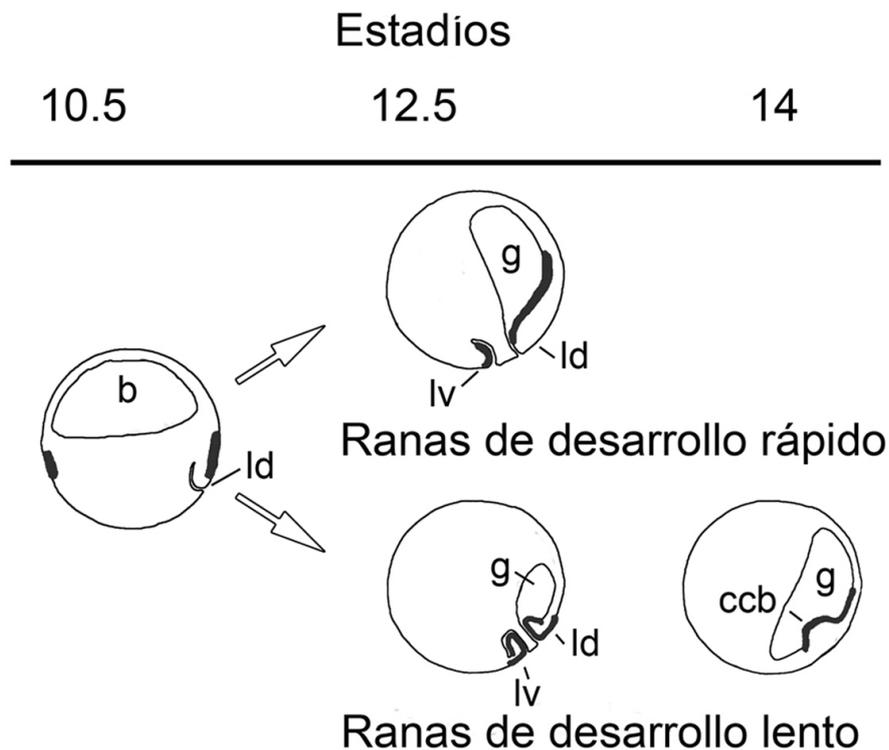


Figura 3. Destino hipotético del mesodermo presuntivo superficial en ranas con desarrollo rápido (*Ceratophrys stolzmanni*, *Engystomops randi* y *Xenopus laevis*) y desarrollo lento (*Epipedobates machalilla*, *Epipedobates tricolor* y *Gastrotheca riobambae*) (Sáenz-Ponce *et al.*, 2012; Shook *et al.*, 2004). El mesodermo presuntivo está resaltado con un trazo grueso en color gris oscuro. El lado dorsal está orientado a la derecha. Se ha omitido el blastocele en todos los embriones, y solamente se muestra en embriones de estadio 10.5. Abreviaturas: b, blastoporo; ccb, collar circumblastoporal; g, gastrocele; ld, labio dorsal del blastoporo; lv, labio ventral del blastoporo. Este diagrama fue modificado de Sáenz-Ponce *et al.*, 2012.

la neurula de ranas con diferentes velocidades del desarrollo y diferentes estrategias reproductivas (Tabla 1) indica que en estas ranas la asimetría izquierda-derecha posiblemente se deba a flujo de fluido en el techo del gastrocele como ha sido demostrado para *X. laevis* y otros vertebrados.

Para complementar los estudios de la determinación de la asimetría izquierda-derecha por flujo de fluido es de interés analizar la presencia del equivalente de la placa del techo del gastrocele tanto en reptiles como en aves. El estímulo que desencadena la asimetría izquierda-derecha es desconocido para los reptiles. En el caso del pollo, no se ha detectado mesodermo presuntivo superficial ni la

presencia de cilios en el techo de la cavidad de la neurula. Se considera que en el pollo, la asimetría izquierda-derecha no está gatillada por cilios, por tal motivo es de interés el análisis comparativo con los embriones de otras aves (Blum *et al.*, 2009). La significativa biodiversidad del Ecuador provee de modelos alternativos del desarrollo cuyo estudio es de interés tanto para documentar la biología de organismos ecuatorianos como para la mejor comprensión de fenómenos del desarrollo. En este caso se recomienda la ampliación de estudios de la determinación de la asimetría izquierda-derecha en vertebrados tales como los reptiles y las aves.

AGRADECIMIENTOS

Se expresa agradecimiento a los colaboradores del Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) por su ayuda durante la realización de este estudio. 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 *E. tricolor*. Este trabajo recibió el apoyo de becas de investigación de la PUCE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amphibiaweb 2012. Information on amphibian biology and conservation. [web application]. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Página de Internet: <http://amphibiaweb.org/>. Consultada 25-abril-2012.
- Antic D, Stubbs JL, Suyama K, Kintner C, Scott MP y Axelrod JD. 2010. Planar cell polarity enables posterior localization of nodal cilia and left–right axis determination during mouse and *Xenopus* embryogenesis. *PLoS One*, **5**(2): e8999.
- Blum M, Andre P, Muders K, Schweickert A, Fischer A, Bitzer E, Bogusch S, Beyer T, Van Straaten HWM y Viebahn C. 2007. Ciliation and gene expression distinguish between node and posterior notochord in the mammalian embryo. *Differentiation*, **75**: 133–146.
- Blum M, Beyer T, Weber T, Vick P, Andre P, Bitzer E y Schweickert A. 2009. *Xenopus*, an ideal model system to study vertebrate left–right asymmetry. *Developmental Dynamics*, **238**: 1215–1225.
- Blum M, Weber T, Beyer T y Vick P. 2009. Evolution of leftward flow. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **20**: 464–471.
- del Pino EM, Ávila ME, Pérez OD, Benítez MS, Alarcón I, Noboa V y Moya IM. 2004. Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *International Journal of Developmental Biology*, **48**: 663–670.
- 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 USA*, **104**: 11882–11888.
- del Pino EM. 2010. La gastrulación en ranas con diversos modos de reproducción. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, **31**: 94–105.
- Gilbert SF. 2010. *Developmental Biology*. 9th ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 711 pp.
- Harland RM. 1991. In situ hybridization: an improved whole–mount method for *Xenopus* embryos. *Methods in Cell Biology*, **36**: 685–695.
- Hatayama M, Mikoshiba K y Aruga J. 2011. IP(3) signaling is required for cilia formation and left–right body axis determination in *Xenopus* embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **410**: 520–524.
- Hausen P y Riebesell M. 1991. The early development of *Xenopus laevis*. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York. 142 pp.
- Moya IM, Alarcón I y del Pino EM. 2007. Gastrulation of *Gastrotheca riobambae* in comparison with other frogs. *Developmental Biology*, **304**: 467–478.
- Nieuwkoop PD y Faber J. 1994. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing. New York, USA. 282pp.
- Sáenz–Ponce N, Santillana–Ortiz JD y del Pino EM. 2012. The gastrocoel roof plate in embryos of different frogs. *Differentiation*, **83**: S62–S66.
- Santillana Ortiz JD y del Pino EM. 2009. Características morfológicas de la gástrula en *Ceratophrys stolzmanni* (Anura: Ceratophryidae). *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, **30**: 50–56.

- Schlueter J y Brand T. 2007. Left-right axis development: examples of similar and divergent strategies to generate asymmetric morphogenesis in chick and mouse embryos. *Cytogenetic and Genome Research*, **117**: 256–267.
- Schweickert A, Vick P, Getwan M, Weber T, Schneider I, Eberhardt M, Beyer T, Pachur A y Blum M. 2010. The nodal inhibitor *Coco* is a critical target of leftward flow in *Xenopus*. *Current Biology*, **20**: 738–743.
- Schweickert A, Walentek P, Thumberger T y Danilchik M. 2012. Linking early determinants and cilia-driven leftward flow in left-right axis specification of *Xenopus laevis*: A theoretical approach. *Differentiation*, **83**: S67–S77.
- Shook DR, Majer C y Keller R. 2004. Pattern and morphogenesis of presumptive superficial mesoderm in two closely related species, *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Developmental Biology*, **270**: 163–185.
- Tian T y Meng A. M. 2006. Nodal signals pattern vertebrate embryos. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **63**: 672–685.
- Vandenberg LN y Levin M. 2012. Polarity proteins are required for left-right axis orientation and twin-twin instruction. *Genesis*, **50**: 219–234.
- Vick P, Schweickert A, Weber T, Eberhardt M, Mencl S, Shcherbakov D, Beyer T y Blum M. 2009. Flow on the right side of the gastrocoel roof plate is dispensable for symmetry breakage in the frog *Xenopus laevis*. *Developmental Biology*, **331**: 281–291.