EVIDENCIAS HISTOLÓGICAS DE LA NEURULACIÓN Y OTROS ESBOZOS PRIMARIOS EN UNA SERPIENTE ENDÉMICA DE CUBA. *TROPIDOPHIS MELANURUS* (SQUAMATA: DIPSADIDAE)

Ana Sanz-Ochotorena, [1], Yamilka Rodríguez-Gómez [1], Javier Torres-López [1], Karel Mederos Perugorría [1], Reyna Lara-Martínez [2], María de L Segura-Valdés. [2] y * Luis F Jiménez-García, [2]
[1] Departamento Biología Animal y Humana. Facultad de Biología Universidad de La Habana. [2] Laboratorio Nanobiología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. email anita@fbio.uh.cu

Resumen

Tropidophis melanurus es una serpiente endémica de Cuba con una distribución pancubana. Es vivípara y la que alcanza mayor longitud –hasta un metro- dentro de este género. No existen estudios que evidencien estadios embrionarios de esta especie ni de otros reptiles cubanos a nivel macroscópico ni microscópico. Por lo cual el objetivo del presente trabajo es exponer el proceso de neurulación y de otros esbozos primarios en *Tropidophis melanurus*. En este trabajo se describen las características histológicas de la formación de esbozos primarios de esta serpiente. Se recolectaron ocho hembras en diferentes localidades del país. Se observaron *in situ* hasta ocho embriones en una de las hembras. Se extrajeron y fijaron embriones a los cuales se les realizó la técnica de histología clásica. Los cortes obtenidos se tiñeron con Hematoxilina-Eosina, Tricrómica de Mallory y Tricrómica de Masson. Las preparaciones fueron observadas al microscopio óptico Nikon E 800. En los cortes histológicos se distinguen: formación del tubo neural o neurulación, definición o diferenciación de las áreas mesodérmicas, la vacuolización de las células notocordales y el destino del endodermo. Estos procesos siguen las características de los vertebrados y se distinguen estadios propios de otros ofidios estudiados.

Introducción

Tropidophis melanurus (Schlegel, 1837) es una de las 32 especies del género *Tropidophis* conocidas comúnmente como "boas enanas". Ellas habitan diferentes islas del Caribe y la mayor diversidad se encuentra en Cuba que es el centro de especiación y diversificación del género con la mitad del total de las especies, todas endémicas (1). Esta boa es vivípara y tiene una distribución pancubana (2). No existe mucha información sobre la biología de esta especie ni sobre su desarrollo embrionario. No existen descripciones sobre la morfología de los embriones de serpientes de esta familia y es escasa la información del tema dentro de los reptiles del orden Squamata. Se han descrito estadios del desarrollo pero sobre todo en serpientes ovíparas (3). Se conoce que aún sin cerrarse totalmente el blastoporo en los vertebrados-cuando esto ocurra en ese sitio se formará el ano y por ello son

deuterostomados - comienza la formación de esbozos primarios de los órganos. Dentro del proceso de la formación de esbozos primarios se distingue la formación de tubo neural o neurulación (4).

Objetivo

Exponer el proceso de neurulación y de otros esbozos primarios, por primera vez en un reptil cubano, de *Tropidophis melanurus.*

Materiales y Métodos

Se recolectaron ocho hembras en diferentes localidades del país. Todos los animales fueron tratados como lo establece el código de ética para su manipulación. Los ejemplares se anestesiaron, se realizó una incisión longitudinal en el abdomen y otra tansversal en la parte inguinal para visualizar las gónadas y conductos *in situ*. Se extrajeron y fijaron fragmentos de embriones y embriones completos encontrados en los oviductos, en paraformaldehído al 4% y fueron sometidos a la técnica clásica de inclusión en parafina (5). Los cortes se obtuvieron en un microtomo manual entre 5 y 7µm y se colocaron en portaobjetos con albúmina como adherente. A las 24 horas los cortes se tiñeron Los cortes se tiñeron con Hematoxilina-Eosina, Tricrómica de Mallory y Tricrómica de Masson. Las preparaciones histológicas se observaron en un microscopio óptico Nikon E 800, con objetivos de 20, 40, 60 y 100X. Las imágenes se registraron digitalmente con una cámara CCD (3CCD, MTI) acoplada al microscopio con el programa FlashPoint 3D FPG.

Resultados y Discusión

Cuatro hembras se encontraban gestantes y tenían embriones en distintas etapas del desarrollo. Se halló una hembra con ocho embriones (Figura 1). Las características de ese embrión corresponden al estadio 2 (3) y se puede apreciar el amnios que los cubre (3, 4). En los cortes histológicos se distinguen:

1. Formación del tubo neural o neurulación (Figuras 2 y 3)
2. Definición o diferenciación de las áreas mesodérmicas (Figura 2)
3. Extensión o tubulación del endodermo (Figura 2)

La forma de constituirse el tubo neural en los vertebrados puede ser por la llamada Neurulación Primaria, la más común, que tienen los anfibios, reptiles, aves y mamíferos (4,6) Figuras 2-4.

En el ofidio objeto de estudio se aprecia del mismo modo la neurulación primaria que una vez constituida la placa neural, ésta se pliega hacia adentro o invagina. Cuando la placa neural invagina se forma el surco neural como resultado del hundimiento y a ambos lados de éste, los pliegues neurales. Se ha propuesto (7) que el empuje del ectodermo epidérmico, que se está extendiendo por epibolia a la vez que la placa neural va invaginando, y el hundimiento del surco neural, son los factores que ayudan al acercamiento progresivo de los pliegues neurales. En las aves, el cierre del tubo neural se inicia al nivel del futuro encéfalo medio y va

cerrándose (como un zipper) en ambas direcciones: anterior y posteriormente (4). No tuvimos evidencia de esto en nuestros hallazgos.

Ciertos genes como Pax3, Sonic hedgehog y Openbrain son esenciales para la formación del tubo neural. En los vertebrados el tubo neural está compuesto por un epitelio llamado neuroepitelio germinal que rápidamente se divide formando las células madre (7, 8). Deben formarse tres capas en el tubo neural en la zona que corresponderá a la médula espinal: una interna hacia el lumen del tubo llamada la capa del epéndimo o ependimaria; una capa intermedia o capa del manto y una capa más externa la zona o capa marginal (4, 8). En la Figura 3 de aprecia la pared del tubo neural pero aún no se distinguen las tres capas. Debe ocurrir que las células de la capa del manto se diferencian tanto en neuronas como en células gliales. Las neuronas hacen conexiones en esa capa entre ellas y envían sus axones hacia fuera creando precisamente la capa marginal la cual es escasa en neuronas. En esa capa marginal las células gliales cubren a los axones con vainas de mielina. La capa del manto contiene los cuerpos neuronales, (sustancia gris) y la marginal o axonal a los axones (sustancia blanca), mientras que las células ependimarias son el revestimiento interno. Esta organización es retenida a través del desarrollo de la médula espinal y hasta el adulto (8). El tubo neural se ensancha en su parte anterior para constituir el futuro encéfalo en todos los vertebrados (Figura 1 y Figura 2).

En la definición de las áreas mesodérmicas, la primera región en delimitarse y que se observa en las Figuras 2, 4 y 5 es el cordamesodermo o mesodermo notocordal, el cual formará el notocordio, un órgano transitorio de sostén y que tiene otra importante función en la inducción de la formación del tubo neural (9). El tejido notocordal a continuación, se redondea y se convierte en una estructura en forma de cilindro cuyo corte transversal muestra en la Figura 5 las típicas células que se vacuolizan mucho. La turgencia que proporciona esas células al notocordio garantiza el soporte del embrión en estas etapas iniciales del desarrollo (Figura 5).

La segunda región es el mesodermo paraxial, mesodermo dorsal o somítico. Las células de este mesodermo formarán los somites, los cuales son bloques de células mesodérmicas a ambos lados del tubo neural que darán lugar a tejidos conectivos dorsales como el hueso, músculo, cartílago y la dermis. En las serpientes se han contado hasta 500 somites (6, 11) (Figura 4).

La tercera región es el mesodermo intermedio el cual formará el sistema urogenital (4). Puede apreciarse en la Figura 2 la formación de los túbulos mesonéfricos, propios del riñón de tipo mesonefros que es funcional en los embriones de los amniotas. El primordio de la gónada de forma en ese sitio también (3, 4).

El mesodermo más alejado del notocordio es el mesodermo de la placa lateral o mesodermo lateral que originará corazón, vasos sanguíneos y todo el mesodermo que cubre las cavidades y órganos además de los componentes mesodérmicos de las extremidades, excepto el músculo. Dentro de las hojas esplácnica y somática del mesodermo lateral se abrirá el celoma Figura 4. En esta serpiente se observa (Figura 2 y Figura 4) la aorta dorsal derivada de la hoja esplácnica. También, este

mesodermo contribuirá a formar membranas extraembrionarias, importantes para la nutrición y protección del embrión (4,6) (Figura 1).

En los reptiles el endodermo se tubula sobre el vitelo y lo rodea totalmente (4, 11). De esta manera constituye el saco vitelino que puede apreciarse en la Figura 4. El endodermo formará el tubo intestinal pimitivo (Figura 2 y Figura 4).

Conclusiones

Los embriones encontrados en el interior de las ejemplares hembras fue un hallazgo ocasional que permitió presentar una evidencia fotográfica del desarrollo embrionario en esta especie. Según lo observado, no se identificaron irregularidades en el desarrollo ni en la disposición de las hojas germinales. El desarrollo embrionario y ubicación de las tres hojas germinales concuerda con el patrón básico de los amniotas y la formación de esbozos primarios sigue las mismas regularidades que en los vertebrados y de las serpientes en particular.

Bibliografía

1. Henderson RW and Powell R. Natural History of West Indian Reptiles and Amphibians. Editor University Press of Florida, Gainesville. 2009; 257pp
2. Hedges SB. Morphological variation and the definition of species in the snake genus *Tropidophis* (Serpentes, Tropidophiidae). Bull.Nat. Hist. Mus. London 2002; 68(2): 83-90.
3. Sandoval MT, Palomas S, Alvarez B. Estadios embrionarios postoviposición en *Atractus reticulatus* (Serpentes: Dipsadidae) FACENA, 2013; Vol.29, pp.23-37.
4. Gilbert S and Barresi M. Developmental Biology. Eleventh Edition. Sinauer Associates, Inc. 2016; 719pp
5. Aguilar M, Coutiño B y Salinas P. Manual de técnicas histológicas e histoquímicas. Facultad de Ciencias. UNAM. Mèxico 1996; 130 pp
6. Boughner JC, Buchtova MF, Diewert K, Hallgrimsson V, Richman B. Embryonic development of *Python sebae* –I: Staging criteria and macroscopic skeletal morphogenesis of the head and limbs. Zoology 2007; 212-230.
7. Rothman TP. Ectoderm: neurulation, neural tube, neural crest. Lectures. Columbia University. 2015; 16pp
8. Colas JF and Schoenwolf GC. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. 2011; Dev. Dynam.221: 217-245
9. Kimelman, D. & Bjornson, C. "Vertebrate Mesoderm Induction: From Frogs to Mice". In Stern CD. *Gastrulation: from cells to embryo*. CSHL Press. 2004. pp. 363.
10. Abzhanov A, Protas P, Grant BR, Grant PR, TabinCJ Bmp4 and Morphological Variation of Beaks in Darwin's Finches 2004; Vol 305 SCIENCE 1462-1464
11. Liu Shu Q. "Early Embryonic Organ Development". Bioregenerative engineering: principles and applications. John Wiley & Sons. 2007; 351pp

ANEXOS

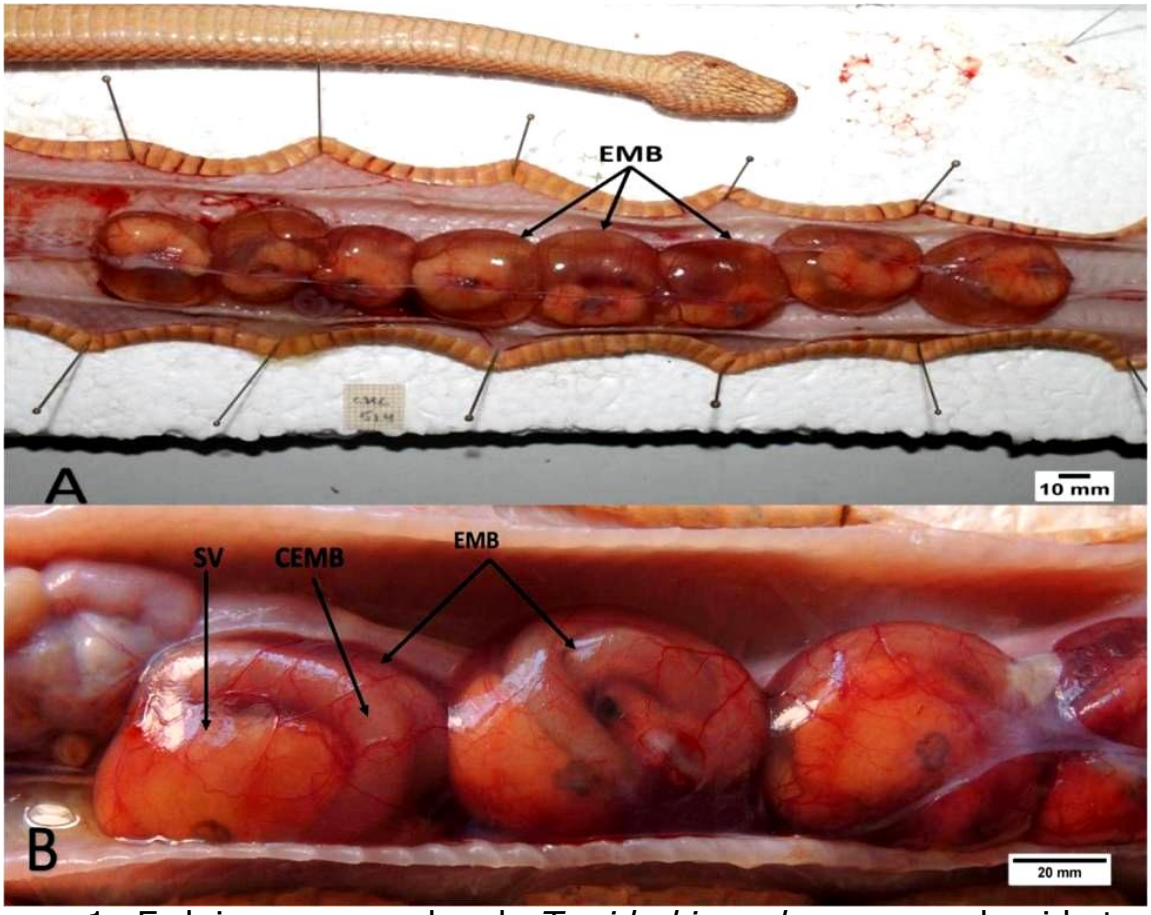

Figura 1: Embriones avanzados de *Tropidophis melanurus* en el oviducto **A:** 8 embriones en formación. **B:** Embriones en formación a mayor aumento. Corresponde a un estadio 2 según (6)

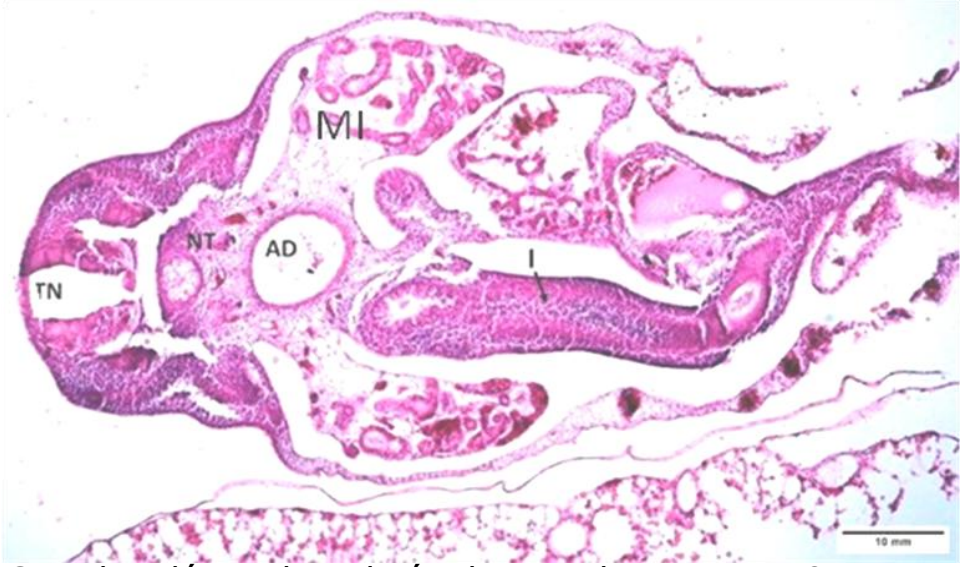

Figura 2. Corte histológico de embrión de *T. melanurus* H-E 10X. TN=tubo neural NT=notocordio AD= aorta dorsal MI=mesodermo intermedio

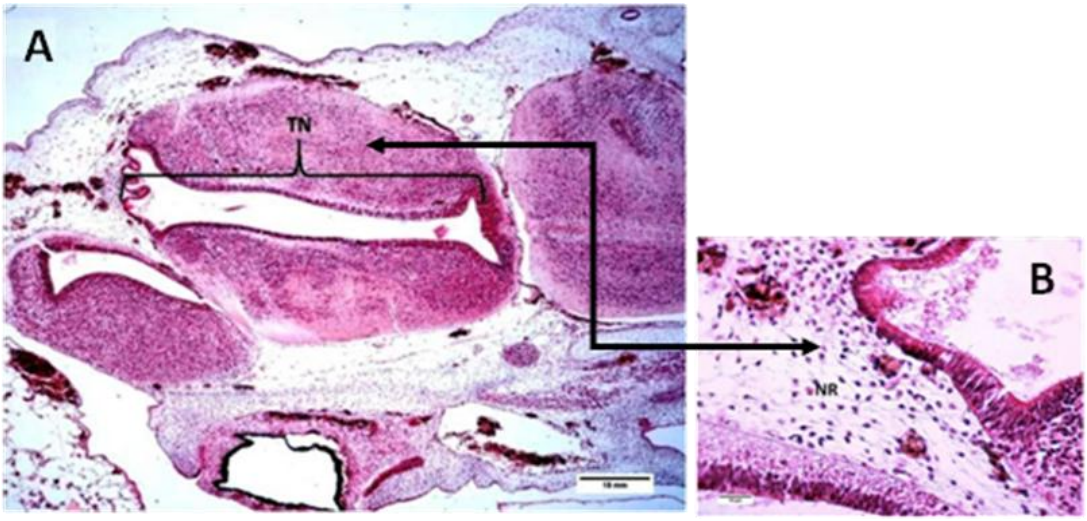

Figura 3. A: Tubo neural de un embrión de *T melanurus* Tricrómica de Mallory 20X. B: Detalle de la anterior. Observe los neuroblastos visibles en la pared del tubo neural HE 40X. TN= tubo neural. NR= neuroblastos

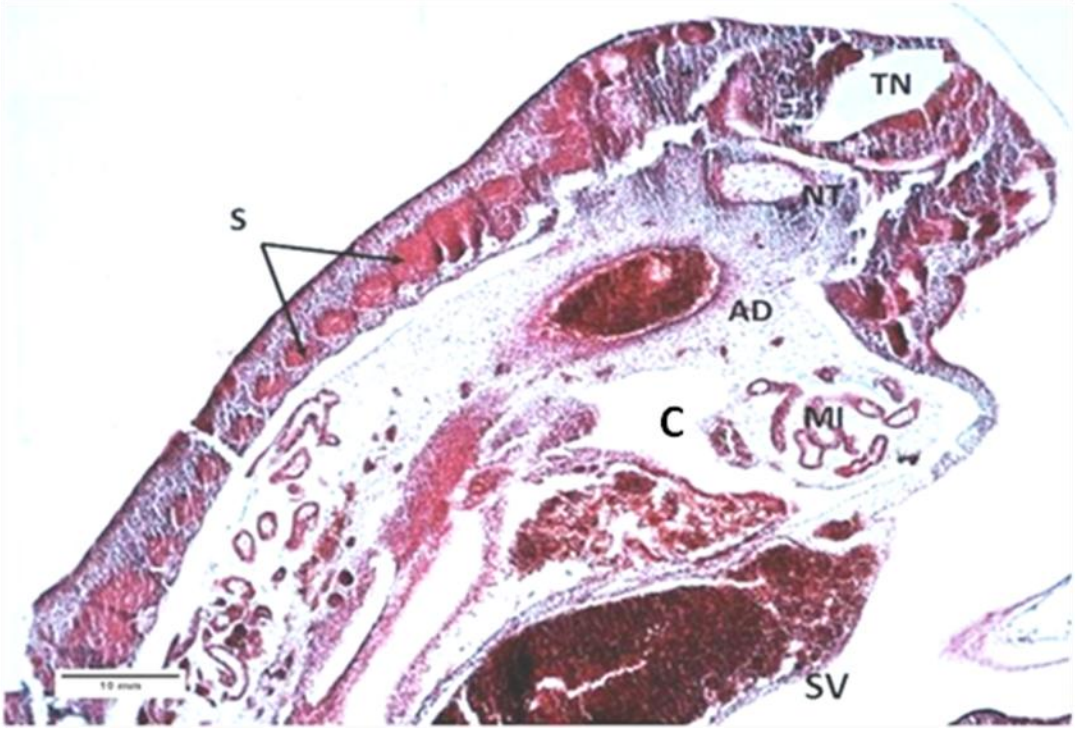

Figura 4: Corte sagital de un embrión de *T.melanurus* Tricrómica de Masson. 5X Observe los somites (S) la aorta dorsal, (AD) el notocordio, (NT) todos derivados del mesodermo. Se aprecia también parte del tubo digestivo y del saco vitelino (SV). Mi= mesodermo intermedio. C=celoma

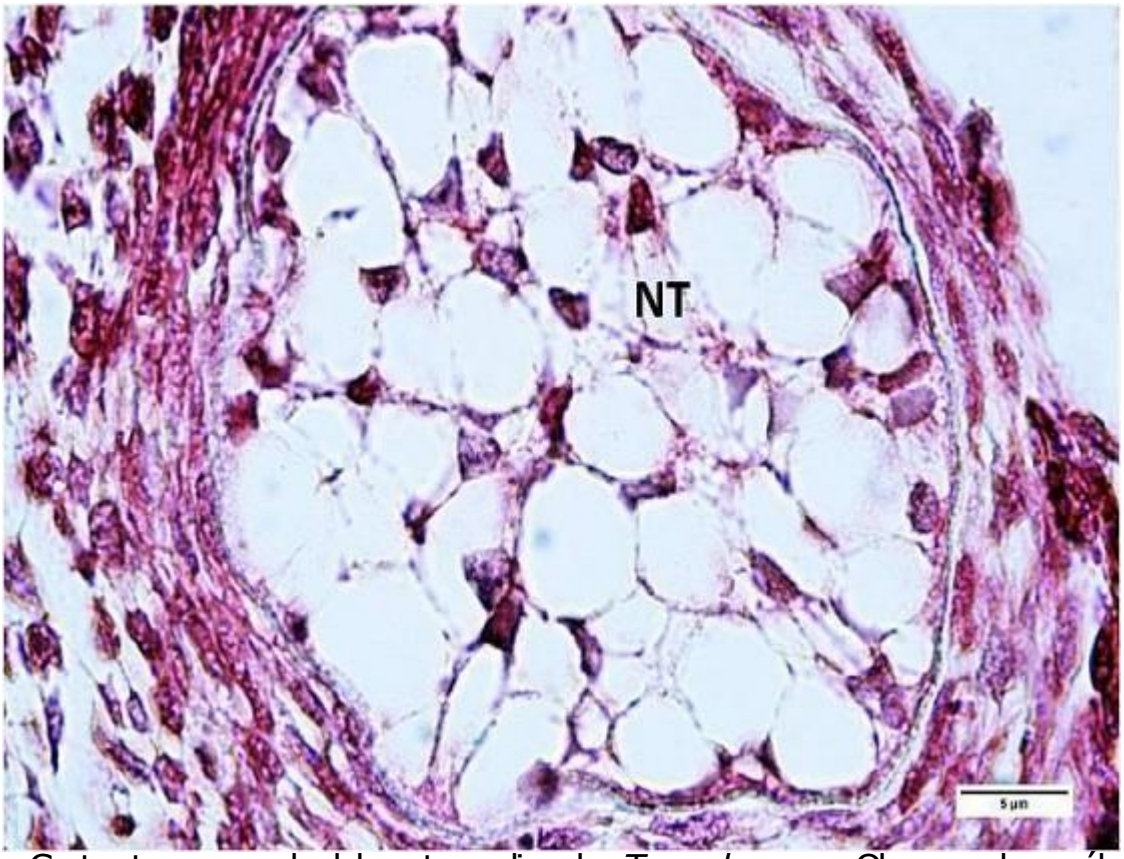

Figura 5: Corte transversal del notocordio de *T. melanurus* Observe las células notocordales muy vacuoladas. H-E 100X